



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI BIOPATOLOGIA E BIOTECNOLOGIE MEDICHE E FORENSI

Dottorato di Ricerca in Biopatologia

Regolazione della longevità in *Saccharomyces cerevisiae*

Ruolo di micro e macronutrienti nella modulazione dell'invecchiamento negli eucarioti

Settore Scientifico Disciplinare MED/04 - Patologia Generale

TESI DI

Dott.ssa GIUSI TAORMINA

COORDINATORE DEL DOTTORATO

Ch.mo Prof. CALOGERO CARUSO

TUTOR

Prof. MARIO GIUSEPPE MIRISOLA

XXIV CICLO - ANNO ACCADEMICO 2011-2013

DOTTORATO



“Interrogando alla lor volta gli Ittiofagi il re riguardo alla loro vita e al vitto, questi rispose che la maggior parte di loro raggiunge i 120 anni, ma che alcuni superano anche questa età [...]. E poiché gli esploratori mostravano di meravigliarsi del numero degli anni, li guidò ad una fontana, lavandosi dalla quale diventavano più nitidi, come se fosse olio; e da essa esalava un profumo come di viole. E narravano gli esploratori che l’acqua di questa fonte era così leggera che niente è in grado di galleggiare su di essa, né legno né quante cose sono ancora più leggere del legno, ma tutte vanno a fondo. A causa di questa loro acqua, se davvero è quale si dice, a causa di essa può darsi che siano di lunga vita, usandola continuamente.”

ERODOTO, Le storie (Libro III), V secolo a.C.

INDICE

INTRODUZIONE

1. Invecchiamento e longevità. Uno sguardo verso il futuro	pag. 5
1.1 Perché invecchiamo? Principali teorie sull'invecchiamento e meccanismi cellulari responsabili dell'invecchiamento	pag. 8
2. Uso dei sistemi modello negli studi sulla longevità	pag. 10
2.1 Ruolo del pathway Insulina/IGF1-dipendente	pag. 14
2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : sistema modello d'eccezione	pag. 16
2.3 Principali pro-aging pathway in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pag. 19
3. Modulazione dell'invecchiamento tramite i nutrienti	pag. 21

<u>SCOPO DELLA RICERCA</u>	pag. 26
----------------------------	---------

MATERIALI E METODI

1. Terreni di coltura	pag. 28
2. Costruzione dei ceppi	pag. 29
3. Chronological life span	pag. 31
4. Frequenza di mutagenesi	pag. 31
5. Test di resistenza allo stress ossidativo e termico	pag. 32
6. Test di risposta ai nutrienti	pag. 32
7. Estrazione delle proteine e analisi immunologica	pag. 33
8. Estrazione RNA e PCR quantitativa	pag. 34
9. Microscopia	pag. 35
10. Test della Beta-galattosidasi	pag. 35
11. Analisi statistica	pag. 36

RISULTATI

1. Aminoacidi e destrosio agiscono attraverso pathway distinti	pag. 38
2. Tor1 e Pkh1/2 convergono su Sch9	pag. 41

3. Specifici aminoacidi diminuiscono la resistenza agli stress e la sopravvivenza attraverso vie di segnalazione differenti	pag. 45
4. Treonina e valina attivano la via di segnalazione pro-invecchiamento TOR/S6K-dipendente	pag. 48
5. La sensibilizzazione cellulare aminoacidi-dipendente coinvolge la regolazione di Rim15 e dei fattori di trascrizione a valle	pag. 50
6. Coinvolgimento della PKA nella trasduzione del segnale dipendente dagli aminoacidi	pag. 56
<u>CONCLUSIONI</u>	pag. 60
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	pag. 64
Ringraziamenti	pag. 78

INTRODUZIONE

1. Invecchiamento e longevità. Uno sguardo verso il futuro

Attraverso i millenni l'uomo è rimasto affascinato dalla possibilità di vivere più a lungo e da sempre cerca in diversi modi di persistere al tempo che passa, se non fisicamente, almeno lasciando una propria impronta nella storia, una testimonianza, un seme che si tramandi attraverso le generazioni. Oggi più che mai assistiamo alla rincorsa alla giovinezza, spesso anche tramite costosi trattamenti cosmetici o dolorosi interventi di chirurgia estetica, poiché la società sembra volerci tutti giovani e belli per sempre. Ma la realtà si mostra ben diversa, giacché i numeri dicono che ormai da più di 50 anni la popolazione mondiale invecchia sempre più. Solo negli ultimi 10 anni in Italia la speranza di vita si è prolungata di 1,7 anni per le donne e di 2,4 anni per gli uomini, anche l'età media è salita da 41,4 anni a 43,3 e la porzione di soggetti con età superiore ai 65 anni è aumentata. Infine, l'indice di vecchiaia, che rappresenta il grado di invecchiamento di una popolazione cioè il rapporto percentuale tra il numero degli ultrasessantacinquenni e il numero dei giovani al di sotto dei 14 anni, è aumentato di ben 17 punti raggiungendo il 147,2% al primo gennaio 2012, ciò ha portato l'Italia al secondo posto tra i Paesi più vecchi d'Europa [1] (Fig.1).

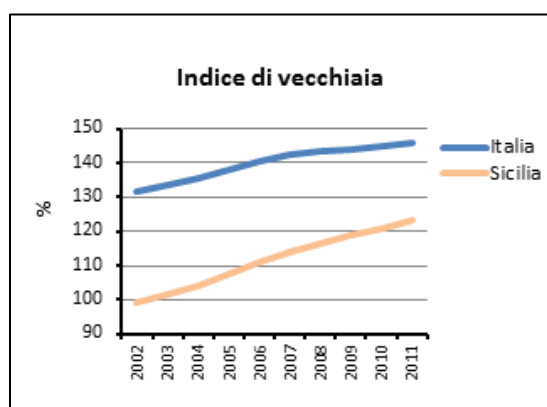


Figura 1. Variazione dell'indice di vecchiaia in Italia e Sicilia in 10 anni (fonte ISTAT)

Grazie ai miglioramenti in campo sanitario e ai progressi in ambito nutrizionale, assistenziale e culturale, nei paesi occidentali la mortalità degli anziani si è ridotta, quindi il numero di individui che raggiunge un'età più avanzata è aumentato e si prevede che anche il numero dei centenari sia destinato ad aumentare ancora: le

previsioni Istat annunciano che tra 20 anni il numero totale dei centenari italiani passerà da 17.430 a 70.038. Un report Istat del dicembre 2001, riguardante le previsioni fino al 2065 relative al futuro demografico del Paese, annuncia che la popolazione continuerà ad andare verso l'invecchiamento graduale: l'età media arriverà a 49,8 anni e gli ultrasessantacinquenni che oggi rappresentano il 20,3% della popolazione oltrepasseranno il 32% già nel 2043 (Fig.2) [2].

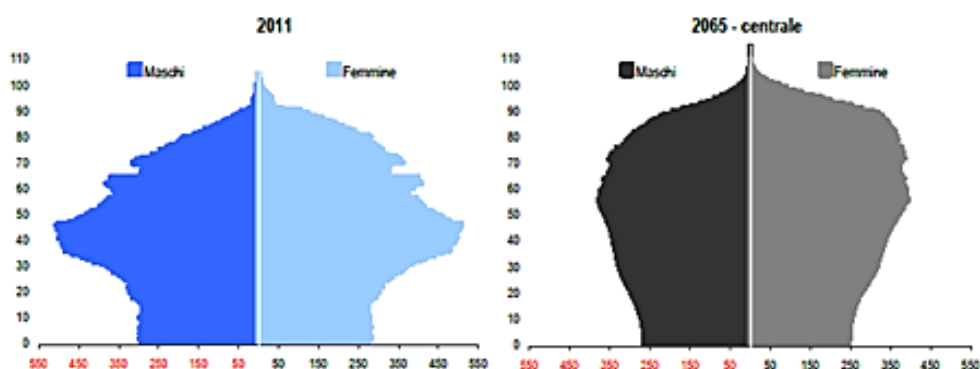


Figura 2. Piramide della popolazione residente al 2011 e al 2065 in Italia [2]. È da notare che già nel 2011 il grafico non ha più la caratteristica forma a piramide, poiché le classi di età inferiori si sono notevolmente ridotte rispetto a quelle centrali, tra 50 anni lo scenario centrale di previsione vede un aumento marcato degli ultrasessantenni.

Sfortunatamente tutto ciò, insieme alla riduzione delle nascite e della popolazione attiva, che rappresenta la forza lavoro, causerà un aumento dell'indice di dipendenza degli anziani, oggi già del 30,9%, fino al 59,7%. L'aumento della popolazione inattiva porterà inevitabilmente con sé delle conseguenze economiche: aumenteranno la domanda di assistenza sanitaria e sociale e la richiesta di risorse destinate alle pensioni, a fronte di una quota di giovani lavoratori che andrà diminuendo.

Tuttavia, è bene ricordare che gli anziani costituiscono una risorsa fondamentale per la società, pensiamo al ruolo che svolgono nelle famiglie, come nonni e talvolta anche sostenendo economicamente i figli sposati, inoltre, sono un importante serbatoio di cultura e tradizioni da salvaguardare e valorizzare. Ma, affinché le potenzialità dell'anziano riescano ad esprimersi al meglio e venga favorita una partecipazione attiva all'interno della società, bisogna che si invecchi bene,

soprattutto ritardando l'insorgenza di tutte quelle patologie e disabilità correlate all'invecchiamento. Infatti, in base ai dati diffusi dal Ministero della Salute nel settembre 2013, raccolti dalla rete di sorveglianza Passi d'Argento coordinata dall'Istituto Superiore di Sanità su un campione di 24000 ultra-sessantaquattrenni in 18 regioni Italiane, il 60% della popolazione anziana è ipertesa e ben il 64% soffre di malattie degenerative (cardiovascolari 33%, malattie respiratorie croniche 25%, diabete 20%, tumore 13%). Inoltre, soprattutto al sud, quasi la metà degli anziani ha difficoltà in 2 o più attività quotidiane come usare il telefono, cucinare o prendersi cura della casa. Questo è l'aspetto più negativo del divenire anziani, d'altra parte vivere più a lungo non giova a nulla se non si è in buona salute.

Ritengo che il tema dell'invecchiamento debba esserci molto caro, perché ci riguarda tutti da vicino e che la medicina dovrebbe impegnarsi non tanto a cercare di renderci immortali, piuttosto per permettere di vivere in salute gli ultimi 10-15 anni di vita che spesso sono accompagnati da disabilità più o meno gravi. Tra l'altro, molte delle condizioni di rischio per la popolazione anziana si possono contrastare con adeguate attività di prevenzione o di cura e favorendo l'invecchiamento attivo anche a livello sociale, affinché si realizzi il diritto alla "qualità totale della vita" come auspica la carta dei diritti dell'anziano [3]. A questo scopo già da alcuni anni l'Organizzazione Mondiale della Sanità divulga le linee guida per la promozione dell'invecchiamento sano. Queste prevedono in sintesi: il divieto di fumare, seguire un'alimentazione ricca di fibre e povera di grassi e sale e mantenere il peso corporeo nella norma, praticare il più possibile attività fisica, evitare l'abuso di farmaci, favorire le relazioni con gli altri e l'autonomia per continuare a sentirsi attivo ed utile, bisognerebbe poi che i governi garantissero le adeguate risorse finanziarie [4]. Tali risorse sono da destinare alla promozione della salute ma anche alla ricerca, poiché è importante continuare ad indagare su quali siano i meccanismi biologici che regolano il processo di invecchiamento al fine di prevenire le patologie età correlate e sviluppare interventi mirati per la modulazione dell'invecchiamento.

1.1. Perché invecchiamo? Principali teorie sull'invecchiamento e meccanismi cellulari responsabili dell'invecchiamento

L'invecchiamento è un processo multifattoriale molto complesso, può essere definito come l'insieme delle modificazioni graduali a cui va incontro l'organismo con il passare degli anni e che aumentano il rischio di morte.

Ci sono diverse ipotesi che tentano di spiegare l'invecchiamento. Una di queste è la teoria della senescenza programmata o dell'orologio biologico, o semplicemente teoria fondamentale, che sostiene che l'invecchiamento sia un processo determinato geneticamente. Infatti si osserva che figli nati da soggetti longevi sono a loro volta tali e che ogni specie è caratterizzata da una durata fissa della vita, ad esempio una rondine vive al massimo 9 anni mentre un elefante arriva fino a 77 anni ed alcune tartarughe anche a 150 anni; infine, esistono malattie genetiche dovute alla mutazione di un singolo gene che sono caratterizzate da invecchiamento precoce. La teoria della senescenza non programmata o teoria stocastica sostiene invece che l'invecchiamento sia un fenomeno del tutto casuale dovuto all'accumulo di danni a carico del DNA in seguito a stress di vario genere, infezioni o altri fattori ambientali.

Dal punto di vista evoluzionistico, Medawar nel 1952 sostenne che l'invecchiamento fosse l'effetto di mutazioni accumulate attraverso le generazioni che sono sfuggite alla selezione naturale in quanto il loro effetto si manifesta solo in età avanzata e quindi successiva all'età avanzata [5]. Analogamente, Williams nel 1957 parlò di geni pleiotropici il cui effetto, benefico in gioventù, contribuirebbe in tarda età alla senescenza (teoria dell'antagonismo pleiotropico) [6]. Nel 1977 Kirkwood propose la teoria del corpo usa e getta, secondo la quale, poiché l'organismo vive solo per il successo riproduttivo, la maggior parte della sua energia è investita per la riproduzione piuttosto che per il mantenimento e il riparo delle cellule somatiche che quindi possono essere eliminate una volta terminata la possibilità di riproduzione [7]. Ciò andrebbe in qualche modo d'accordo con l'osservazione che individui di *Drosophila* che si riproducono tardivamente vivono più a lungo, mentre ceppi che si riproducono prima vivono meno, inoltre, l'eliminazione delle cellule germinali da quest'ultime ne estende la sopravvivenza [8].

Aldilà delle teorie sull'invecchiamento la ricerca ha permesso di individuare alcuni dei meccanismi molecolari che stanno alla base dell'invecchiamento cellulare. Nessuno di questi è l'unico responsabile, ma più probabilmente tutti insieme contribuiscono alla senescenza cellulare. Tra gli eventi che certamente influiscono sull'invecchiamento a livello molecolare, c'è l'accumulo di danni e mutazioni a livello del DNA mitocondriale e genomico, probabilmente ciò è dovuto al fallimento dei meccanismi di riparo, in particolare è stato osservato che in diverse specie una maggiore sopravvivenza è associata ad alti livelli di PARP-1, un importante mediatore della risposta al danno sul DNA indotto da stress [9]. Un'altra modifica in cui incorre il materiale genetico con il passare del tempo è la perdita dei telomeri, queste strutture importanti per l'integrità dei cromosomi, si accorciano ad ogni replicazione, pertanto tutte le cellule sono destinate ad invecchiare e da questo potrebbe dipendere il numero limitato di replicazioni a cui ogni cellula può andare in contro prima di raggiungere la cosiddetta senescenza replicativa, è stato inoltre osservato che questo accorciamento è accelerato in cellule che subiscono elevati livelli di stress [10]. Anche le proteine possono subire dei danni ad esempio di tipo ossidativo e con l'invecchiamento l'eliminazione delle macromolecole danneggiate attraverso il proteasoma e le chaperonine sembra venire meno impedendo il corretto turnover delle stesse.

Il maggiore responsabile del danno al DNA e alle proteine è indubbiamente lo stress ossidativo. Specie reattive dell'ossigeno (ROS) derivano dal normale metabolismo cellulare, qualora però la loro produzione non venga adeguatamente controbilanciata dall'attività riduttiva degli enzimi preposti, ovvero le superossido-dismutasi (SOD), la glutatione perossidasi e la catalasi, molecole come l'anione superossido e il perossido di idrogeno divengono substrato per la formazione di molecole altrettanto reattive come il perossinitrito (Fig.3). L'accumulo di tutte queste specie reattive causa l'ossidazione di diversi substrati organici danneggiandoli ed in seguito al danno intra-mitocondriale a livello dei componenti della catena respiratoria si instaura un circolo vizioso che accelera la produzione di ROS. In diversi organismi modello è stato osservato che l'aumento dei sistemi di difesa nei confronti dei ROS, in particolare le SOD, correlano con una maggiore

sopravvivenza e proteggono dal deficit cognitivo normalmente associato all'invecchiamento [11-15].

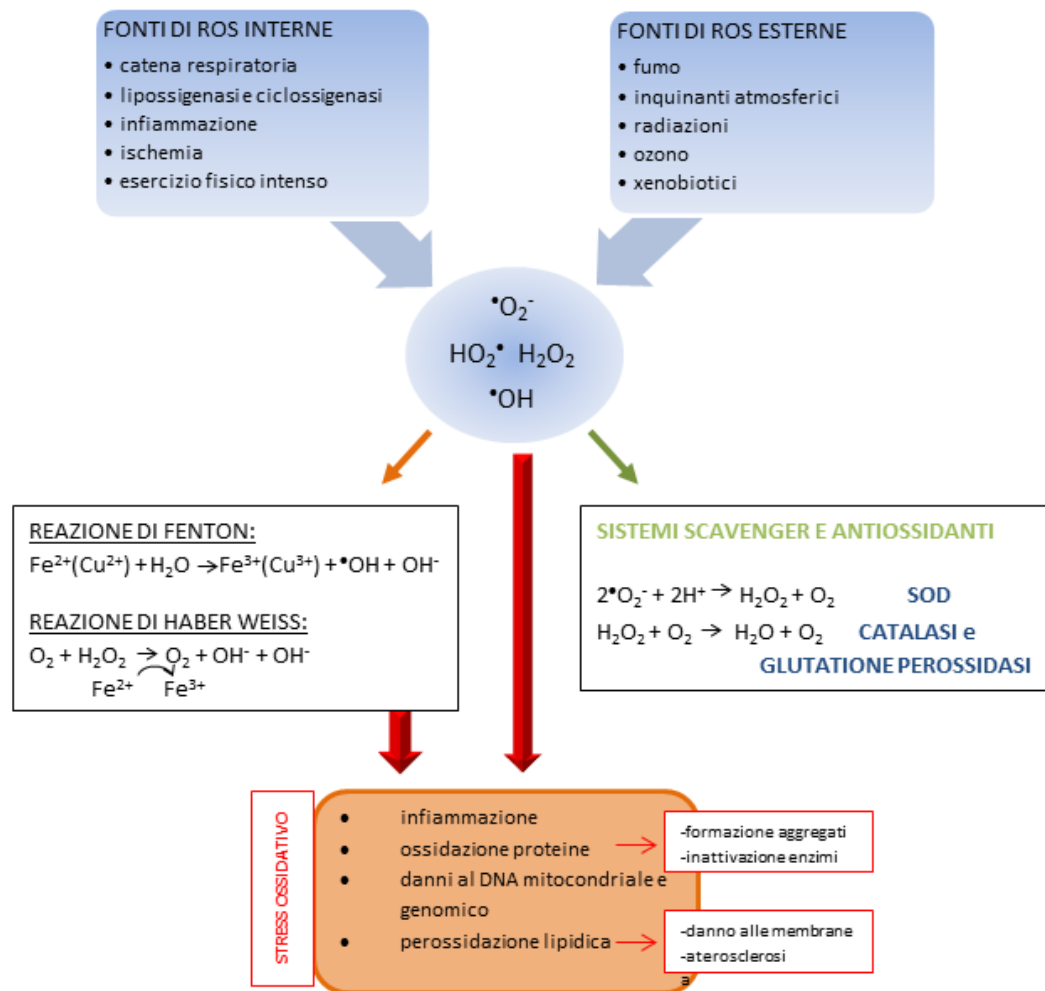


Figura 3. Genesi ed effetti dello stress ossidativo

2. Uso dei sistemi modello negli studi sulla longevità

Oltre a indagare sulle origini dell'invecchiamento e sui processi fisiologici generali che lo caratterizzano, gli studi sulla longevità perseguono uno scopo più ambizioso: riuscire a determinare a livello molecolare quali siano i mediatori cellulari che modulano la progressione verso l'invecchiamento. Molti passi in avanti sono stati fatti, ma in che modo si è riusciti a capire attraverso quali meccanismi si realizzi l'invecchiamento e quali siano i geni e le vie metaboliche coinvolte? Una fonte di informazioni di non trascurabile importanza è lo studio dei soggetti affetti dalle sindromi progeroidi, ossia quelle patologie che favoriscono

l'insorgenza precoce dei segni dell'invecchiamento [16]. La più nota di queste malattie è la sindrome di Werner causata da una delezione omozigote a livello di un gene che codifica per un'elicasi della famiglia RecQ [17]. Le cellule degli individui affetti da questa sindrome hanno un alto tasso di insorgenza di mutazioni somatiche, in particolare delezioni, a causa dell'instabilità genomica dovuta all'assenza dell'elicasi funzionante [18]. I segni della patologia insorgono durante la pubertà, quando il normale sviluppo è impedito e cominciano a comparire prematuramente i segni caratteristici della vecchiaia come l'atrofia della pelle e dei tessuti sottocutanei, la comparsa di capelli bianchi o la loro caduta, la cataratta, l'osteoporosi, l'aterosclerosi, il diabete di tipo 2, e l'insorgenza di neoplasie che molto frequentemente sono la causa di morte intorno all'età di 47-48 anni [19]. Pressappoco gli stessi sintomi si hanno per la malattia di Steinert, detta anche distrofia miotonica, in questo caso possono essere mutati 2 diversi loci DM1 e DM2 rispettivamente sui cromosomi 19 e 3. La mutazione autosomica dominante a livello di DM1 è costituita da un'amplificazione di ripetizioni CTG nella regione 3' non tradotta di una proteina chinasi importante nella regolazione della forma e della dimensione cellulare, questo tipo di mutazione probabilmente compromette il corretto splicing della proteina e quindi il corretto funzionamento della stessa [20]. Nella sindrome di Seip-Berardinelli o lipodistrofia, oltre ai segni di progeria, si osservano aberrazioni nel metabolismo lipidico e agenesia o distrofia del tessuto adiposo attivo, mentre dei piccoli depositi si accumulano a livello di organi e tessuti come le orbite o le regioni periarticolari compromettendo i movimenti [21-22]. Il responsabile di questo fenotipo potrebbe essere il malfunzionamento del gene *RXRA* sul cromosoma 9 che codifica per il recettore alpha dell'acido retinoico che è importantissimo per la differenziazione degli adipociti [23]. Infine, la sindrome di Hutchinson-Gilford è la più rara delle progerie, i soggetti affetti hanno un fenotipo molto caratteristico, infatti l'errato sviluppo causa anomalie muscoloscheletriche, la morte inoltre è molto precoce, in media giunge intorno ai 13 anni [24]. L'origine genetica di questa sindrome non è stata ancora chiaramente stabilita, ma si è osservato che le cellule hanno i telomeri corti e una diminuita attività di riparo dei danni al DNA [25-26].

Tuttavia, come possiamo facilmente immaginare, l'invecchiamento fisiologico non può essere dovuto alla comparsa di una mutazione in un singolo gene, ma deve essere il risultato di più processi che è necessario indagare. Come in molte altre scienze, anche in biogerontologia vengono largamente usati vari sistemi modello, diversi dall'uomo, per capire a fondo i vari eventi in grado di modulare la longevità e la genetica dell'invecchiamento. Ciò è possibile poiché, a dispetto delle numerose differenze morfologiche tra gli organismi, i viventi condividono gran parte dei geni responsabili del metabolismo cellulare. Ad esempio, ben il 30% dei geni implicati in patologie umane trovano omologia nelle cellule eucariotiche di lievito [27]. L'impiego di questi organismi è naturalmente un vantaggio per gli ovvi motivi pratici e nel rispetto dei limiti etici.

I primati sono adottati come modello di mammiferi più vicini all'uomo, in particolare la specie di scimmia *Macaca mulatta* in cui si riscontrano i segni dell'invecchiamento tipici dell'uomo e anche le patologie correlate all'invecchiamento che colpiscono l'uomo. Tuttavia questi animali non sono facilmente gestibili e richiedono un consumo di ingenti risorse, pertanto è più diffuso l'impiego di topi e ratti la cui fisiologia e le cui funzioni cellulari sono molto simili a quelle umane e la dieta e l'ambiente possono essere strettamente controllate con il vantaggio di potere anche realizzare delle modifiche genetiche. Purtroppo però, più un organismo è complesso, più difficile diventa distinguere ad esempio se le differenze osservate dipendano dal gene deletato in sé o da effetti pleiotropici dovuti all'assenza del gene. Pertanto si tende a impiegare animali più semplici e con una sopravvivenza più breve che permetta di fare molti più esperimenti in un tempo più breve e con minori costi, oppure colture cellulari di mammifero o di lievito. La riproducibilità dei dati ottenuti anche negli organismi evolutivamente superiori è tuttavia necessaria per confermare la validità dei fenomeni osservati anche nell'uomo. Tra i modelli animali più semplici sono stati largamente utilizzati *D. melanogaster* e *C. elegans*.

Drosophila melanogaster ha una breve sopravvivenza ed un alto tasso di riproduzione, ciò consente di manipolare e studiare diverse generazioni in breve tempo e su queste osservare l'effetto di tutti gli eventi biologici e ambientali che influenzano l'intera vita dell'organismo. Gli studi su questo organismo hanno

permesso di scoprire che la longevità aumenta in seguito all'overespressione di geni coinvolti nella risposta agli stress come *hsp70* (che codifica per l'heat shock protein 70), *MnSOD* (che trascrive per la superossido dismutasi), e *mei-41* (coinvolto nel riparo del DNA) [28]; mentre la perdita di funzione del pathway che comprende il recettore ormonale Dts3 e quello per l'insulina InR, chico, che è il substrato di InR [29-30], e il fattore di trascrizione dFOXO aumenta notevolmente la durata della vita [31].

Il nematode *Caenorhabditis elegans* è facile da gestire in laboratorio, ha una semplice specializzazione cellulare e tissutale e da più di 30 anni è usato come organismo modello per gli studi di genetica e sulla longevità. In *C. elegans* i geni che regolano la longevità sono stati messi in relazione con l'ingresso in uno stadio larvale non riproduttivo chiamato larva "dauer"; infatti, quando le condizioni ambientali non sono ottimali per la riproduzione, il nematode va incontro a cambiamenti anatomici e fisiologici che aumentano la resistenza e la possibilità di sopravvivere in condizioni sfavorevoli finché le condizioni ambientali non migliorano. È stato osservato che per la formazione della dauer devono essere inattivi DAF-2, omologo del recettore per insulina e IGF-1 [32], e la fosfatidilinositolo-3-chinasi AGE-1 da esso attivata [33], questi fattori sono importanti per la normale crescita e la riproduzione attraverso l'inibizione del fattore di trascrizione DAF-16, membro della famiglia di proteine FOXO, che reprime i geni necessari alla riproduzione in risposta a scarse disponibilità di cibo [34]. I vermi adulti che hanno questo pathway compromesso vivono dal 50 al 300% in più rispetto ai vermi "wild type". Allo stesso tempo, mutazioni in *daf-18*, omologo della fosfatasi PTEN che regola negativamente il segnale dipendente dall'insulina, sopprimono l'aumento della sopravvivenza dovuto alle mutazioni su *daf-2* e *age-1* [35-35]. L'allungamento della sopravvivenza di tali mutanti è stato messo in relazione con l'aumento di resistenza agli stress ossidativi poiché i mutanti *daf-2* esprimono alti livelli di enzimi antiossidanti come la catalasi e la superossido-dismutasi e bassi livelli di radicali liberi, e nei mutanti *age-1* è prevenuta la diminuzione età-correlata dei livelli di catalasi [37]. Tra le altre proteine identificate come importanti nella longevità del nematode, troviamo la proteina chinasi fosfatidilinositolo dipendente PDK1, la chinasi AKT e gli enzimi

mitocondriali Clk coinvolti nella sintesi dell'ubichinone. Nello specifico, la riduzione della funzione di Clk-1 determina la formazione di vermi più piccoli che vivono dal 15 al 30% in più rispetto ai wild type, probabilmente grazie alla diminuzione del metabolismo basale e del danno ossidativo [38].

Le vie metaboliche identificate nella *Drosophila* e in *C. elegans* sono state confermate anche nei topi. Tra i geni la cui delezione aumenta in maniera significativa la sopravvivenza dei topi ne sono stati identificati alcuni coinvolti nella resistenza agli stress come GPx4, che codifica per la glutatione perossidasi, e alcuni che fanno parte del pathway dell'insulina come FIRKO, recettore dell'insulina nel tessuto adiposo [39]. In particolare, gli "ames dwarf mice", in cui non sono prodotti una serie di ormoni tra cui l'ormone della crescita (GH), la prolattina e l'ormone che stimola la tiroide, vivono approssimativamente il 50% in più del normale [40] ed hanno livelli elevati di catalasi [41] e Cu/Zn SOD [42] e bassi livelli di specie reattive dell'ossigeno. Anche gli animali che hanno mutazioni nel recettore per l'ormone della crescita vivono più a lungo e mostrano una minore incidenza di disabilità cognitiva età correlata e una migliore sensibilità all'insulina [43], mentre quelli che sovraesprimono il GH mostrano segni di invecchiamento accelerato [44]. Infine, l'inibizione del pathway che coinvolge mTOR tramite la somministrazione di rapamicina o la delezione della chinasi S6, aumenta la sopravvivenza e riduce l'incidenza delle patologie età correlate tra cui le disfunzioni immunitarie e l'insulino-resistenza [45]. Anche l'inattivazione della via della PKA aumenta la sopravvivenza e causa la riduzione dell'insorgenza di tumori e di insulino-resistenza con l'età. Quasi tutti questi mediatori sono stati prima scoperti nel lievito, di cui discuterò dettagliatamente più avanti, e la loro funzione è stata poi confermata negli organismi superiori.

2.1. Ruolo del pathway insulina/IGF1-dipendente

È evidente come dagli studi su tutti gli organismi sia emerso il ruolo fondamentale del pathway dell'insulina/IGF-1 nella regolazione del processo dell'invecchiamento e principalmente attraverso la regolazione dei geni coinvolti nella risposta agli stress e nel riparo del danno. Mutanti di lievito, *Drosophila* e *Caenorhabditis* che hanno mutazioni che non permettono il normale funzionamento di tale via vivono

infatti più a lungo. Dati simili si sono riscontrati anche nell'uomo. Si è infatti osservato che normalmente durante l'invecchiamento la sensibilità all'insulina decresce. Di contro nei centenari, che rappresentano un modello di invecchiamento con successo, si riscontra una maggiore sensibilità all'insulina rispetto a soggetti meno anziani, e spesso questo dato è accompagnato da livelli di IGF-1 nel plasma più bassi [46] e da un basso grado di stress ossidativo e alte difese antiossidanti [47-48]. Ciò porta un vantaggio per l'anziano poiché l'insulino-resistenza e lo stress ossidativo sono importanti fattori di rischio associati alle patologie come l'ipertensione o l'aterosclerosi e il diabete che colpiscono i soggetti anziani. Un altro dato interessante riguarda un particolare polimorfismo a carico del recettore IGF-IR che, associato ad un altro polimorfismo della chinasi PI3KCB, si riscontra con maggiore frequenza negli individui che vivono più a lungo e correla con bassi livelli plasmatici di IGF-1 [49]. Anche alcune varianti geniche del fattore di trascrizione FOXO sono state associate con una maggiore sopravvivenza [50]. La serie di similitudini riscontrate nei meccanismi di regolazione dell'invecchiamento in tutti gli organismi modello e nell'uomo ci fanno ritenere che questi stessi meccanismi siano stati conservati durante l'evoluzione dal lievito fino ai mammiferi [51-52]. In particolare, sia nel lievito che negli invertebrati e nei mammiferi, compreso l'uomo, il pathway insulina/IGF1 dipendente è regolato e mediato da fattori omologhi nella struttura o nella funzione; ad esempio la sequenza proteica di DAF-2 mostra il 34% di identità con IGF-IR dei mammiferi, AGE-1 è per il 27% identica alla chinasi PI3KCB e DAF-16 per ben il 49% è identica a FOXO1A, mentre IRS-1 ha un'identità del 30% con CHICO della *Drosophila*. Inoltre, questi fattori in tutti gli organismi regolano processi simili come la resistenza allo stress ossidativo, il metabolismo e l'utilizzazione dei nutrienti e naturalmente la durata della vita. Uno studio del 2007 ha comparato i geni la cui trascrizione varia durante l'aumento della sopravvivenza dovuto all'inibizione del pathway insulina/IGF-1 in tre diverse specie animali: *C. elegans*, *Drosophila* e il topo. Ne è risultato che ci sono evidenti similitudini che riguardano in particolare due principali categorie di geni, una che comprende geni coinvolti nella sintesi proteica che sono ipoespressi (ciò è stato separatamente osservato anche nel lievito [53]), e la seconda che comprende geni coinvolti nella detossificazione che

sono invece iperespressi, in particolare la glutatione-S-transferasi [54], è noto infatti che l'iperespressione dei fattori di trascrizione che regolano il metabolismo degli xenobiotici può aumentare la sopravvivenza di *Caenorhabditis* e *Drosophila* [55]. È ovvio che nell'uomo la complessità dei meccanismi di regolazione è maggiore, basti pensare solo al fatto che nell'uomo ci sono 3 isoforme del recettore per l'insulina che potrebbero avere ruoli differenziati nella regolazione di diversi meccanismi, difatti, mutazioni nel recettore per l'insulina, che negli altri organismi hanno un effetto positivo per quanto riguarda la longevità, nell'uomo causano il diabete. Tuttavia le notevoli affinità riscontrate confermano che il meccanismo dell'invecchiamento, nello specifico mediato dalla via insulino-dipendente, è stato conservato durante l'evoluzione in tutti gli eucarioti dal lievito fino all'uomo (Fig4).

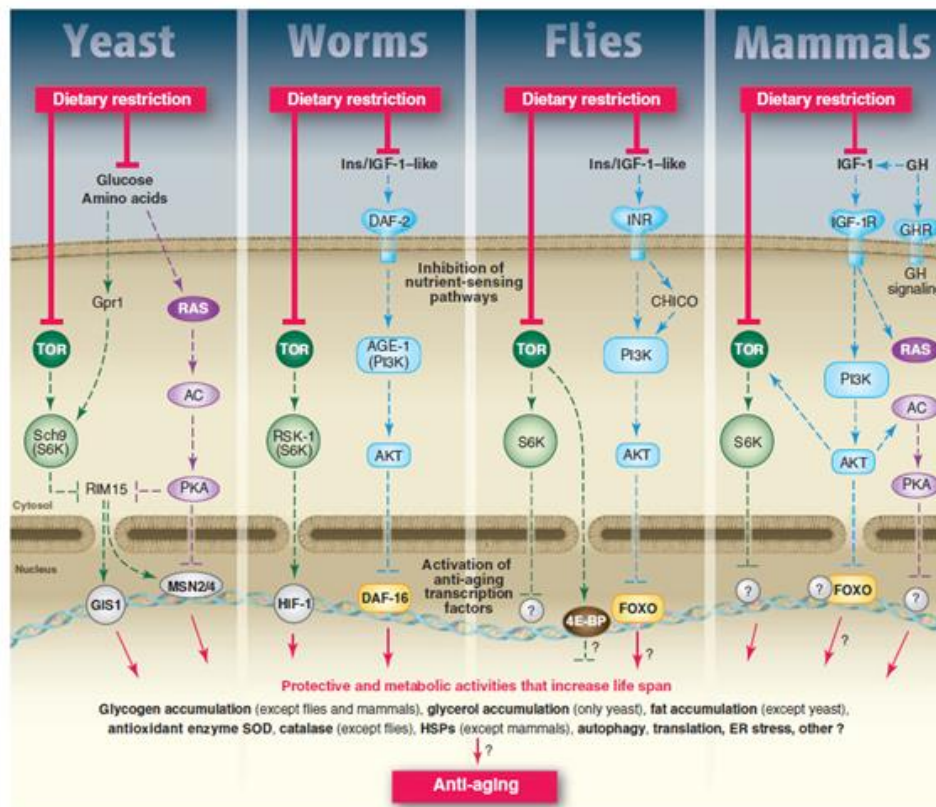


Figura 4. Pathway insulino/IGF-1 dipendente nelle diverse specie [52].

2.2. *Saccharomyces cerevisiae*: sistema modello d'eccezione

Se il nematode e il moscerino della frutta sono utili per capire il ruolo relativo di differenti tipi di cellule e tessuti nell'invecchiamento, il lievito consente indubbiamente di approfondire meglio l'invecchiamento dal punto di vista

genetico e molecolare. I funghi in generale, ed il lievito in particolare, sono buoni modelli per analizzare i fattori ambientali che influenzano la longevità e soprattutto per studiarne gli effetti su un'intera popolazione. I maggiori vantaggi dell'impiego di *S. cerevisiae* come sistema modello derivano dalla semplicità di coltura in condizioni strettamente controllate ottenendo una progenie numerosa in poco tempo e con modeste risorse economiche. Un altro beneficio dipende dalla possibilità di applicare largamente al lievito numerose tecniche di biologia molecolare e genetica, in particolare, la creazione di mutanti deleti per determinati geni e lo studio del loro fenotipo è stato molto utile per determinare la funzione dei geni e il coinvolgimento dei prodotti genici in determinate vie metaboliche. È possibile, inoltre, effettuare esperimenti di trans-complementazione tra cellule umane e di lievito per indagare sulla funzione dei geni umani. Infine, disponiamo ormai, oltre che dell'intera sequenza del genoma di lievito [56], di diversi database e strumenti di bioinformatica che facilitano l'analisi dei risultati ottenuti dalla ricerca sul lievito [27]. Per questi motivi *Saccharomyces cerevisiae* è stato ampiamente usato, prima ancora che per gli studi sull'invecchiamento, per comprendere vari processi cellulari di base come il controllo del ciclo cellulare [57] e il traffico delle proteine [58].

Il ceppo di lievito più comunemente utilizzato in laboratorio e soprattutto negli studi sull'invecchiamento è il DBY746. Tipicamente una popolazione aploide di questo lievito, in presenza di sufficienti risorse nutrizionali e adeguate condizioni ambientali, è in grado di crescere rapidamente raggiungendo la densità massima dopo circa 48 ore, le cellule infatti si moltiplicano per mitosi fino a quando i nutrienti terminano. Quando il glucosio a disposizione si esaurisce, le cellule entrano nella fase del "post-diauxic shift" in cui il metabolismo è ancora molto attivo ma di tipo respiratorio e non più fermentativo. Alla fine di questa fase le cellule cessano di dividersi ed entrano nella fase stazionaria in cui subiscono delle trasformazioni fisiologiche e biochimiche che le rendono capaci di resistere anche in condizioni ambientali sfavorevoli, accumulano il glicogeno e sviluppano pareti cellulari spesse; sono inoltre sensibilmente più termotolleranti e resistenti alle varie forme di stress ossidativo. Questo stato post mitotico e metabolicamente poco attivo dura generalmente fino al quinto giorno di crescita. Successivamente,

se l'ambiente ridiventa favorevole la divisione riprende, altrimenti le cellule cominciano a morire arrivando al di sotto dell'1% della popolazione originaria in una decina di giorni. In questa fase in alcuni casi si può verificare un fenomeno chiamato ricrescita adattativa o "gasping" in cui una porzione di cellule comincia a ricrescere sfruttando come nutrienti i componenti rilasciati dalle cellule che vanno incontro a morte [59] (Fig.5).



Figura 5. Tipica curva di crescita di una coltura di lievito

L'invecchiamento nel lievito può essere misurato in due modi diversi. Uno prende il nome di invecchiamento replicativo (RLS) e misura il numero di volte che una singola cellula è in grado di replicarsi prima di andare in contro a senescenza replicativa e morte ed è un buon modello per valutare la senescenza dei tessuti in rapida divisione cellulare. L'altro è l'invecchiamento cronologico (CLS) che descrive la sopravvivenza di una popolazione di cellule in fase post mitotica ed è un buon modello per valutare l'invecchiamento dei tessuti adulti in fase post-mitotica e delle cellule degli eucarioti superiori che alternano fasi di divisione a fasi di non divisione (Fig.6) [60].

L'aumento della sopravvivenza cronologica in seguito a interventi genetici o ambientali si associa nel lievito all'aumento della resistenza allo stress ossidativo e termico, pertanto anche la risposta agli stress è un parametro altrettanto utile per descrivere la longevità di una popolazione di lievito.

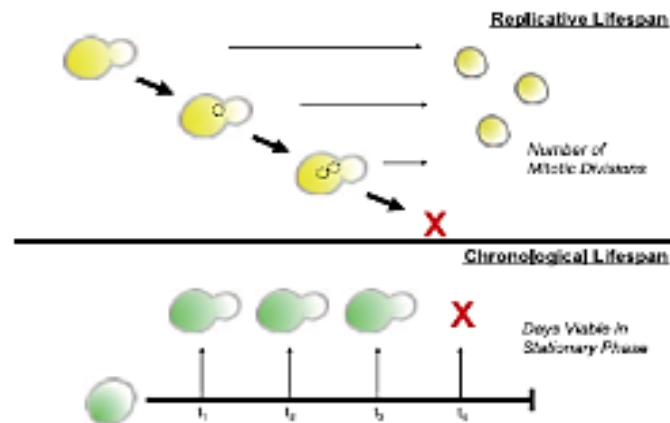


Figura 6. Schema esplicativo su RLS CLS [60]

2.3. Principali pro-aging pathways in *Saccharomyces cerevisiae*

Il primo pathway di modulazione dell'invecchiamento negli eucarioti è stato descritto grazie a studi genetici condotti su *Saccharomyces cerevisiae*. Tale pathway dipende dall'attivazione della proteina chinasi Ras2. La delezione di Ras2, infatti, è associata ad un raddoppiamento della sopravvivenza e ad un aumento di resistenza agli stress [61-62]. L'attivazione di Ras2 comporta la produzione, da parte dell'adenilato ciclasi, di AMP ciclico il quale, legandosi alle subunità regolatrici della proteina chinasi A (PKA), ne consente il distacco permettendo quindi l'attivazione della chinasi stessa. L'attivazione della PKA porta all'inibizione di Rim15 che altrimenti regolerebbe positivamente i fattori di trascrizione Gis1 [63], Msn2 e Msn4 la cui funzione è quella di attivare, legando rispettivamente le sequenze PDS (Post Diauxic Shift) e STRE (STress Responsive Element), l'espressione di geni coinvolti nella sopravvivenza e nella risposta agli stress come alcune heat shock proteins, la catalasi citoplasmatica e le due Superossido-dismutasi [64-65], o nella riparazione dei danni al DNA come il gene DDR2 [66]. L'effetto globale di questa inibizione è la diminuzione della durata della vita e della resistenza agli stress. A supporto del ruolo di Ras2 nella modulazione dell'espressione di questi geni, evidenze sperimentali mostrano che la delezione di Msn2/Msn4 o Sod2 reverte il fenotipo longevo del mutante Ras2Δ [67]. Inoltre, la presenza di alleli attenuati dell'adenilato ciclasi fa aumentare la sopravvivenza,

confermando il ruolo di Ras2 nell'invecchiamento cronologico. La chinasi Rim15 subisce l'inibizione anche da parte di Sch9 (serina/treonina chinasi ortologa di S6K, Akt/PKB di mammifero) che, attivata da TOR, rappresenta l'elemento chiave del secondo importante pro-aging pathway identificato nel lievito [62] in quanto la sua delezione ne triplica la sopravvivenza. Tor1, che attiva direttamente sch9 tramite fosforilazione su diversi siti tra cui la treonina 737 [68], è perciò un ulteriore importante fattore di regolazione della longevità e la sua inattivazione porta ad un aumento della sopravvivenza cronologica [63, 69] ma in maniera meno robusta rispetto alle delezioni di ras2 o sch9 [70].

L'effetto dell'inattivazione delle due vie di segnalazione sembra quindi essere dovuto ad una maggiore espressione dei geni coinvolti nella resistenza agli stress in particolare di tipo ossidativo, infatti, nei ceppi ras2Δ i livelli di espressione di SOD2 risultano raddoppiati rispetto al ceppo wild type [71]. O ancora, l'over-attivazione del fattore di trascrizione che risponde agli stress termici HSF1 e l'over-espressione di YAP1, un altro fattore di trascrizione attivato dagli stress ossidativi, hanno un effetto positivo sulla sopravvivenza [72-73]. Tuttavia la sola over-espressione delle superossido-dismutasi e delle catalasi non consente di raggiungere i livelli di sopravvivenza ottenuti con la delezione di Ras2 ed Sch9 pertanto questo non può essere l'unico meccanismo coinvolto nella regolazione della longevità. È interessante sottolineare che la via di Ras2 e quella di Sch9 hanno molti elementi in comune, ad esempio stimolano la crescita e la glicolisi e rispondono entrambe ai nutrienti. Sch9 è stato peraltro isolato come soppressore multi copia di un allele termosensibile di Cdc25, il fattore di scambio del nucleotide legato a Ras [74]. Inoltre, il carbossiterminale di questa proteina somiglia a una chinasi cAMP-dipendente. Infine, è stato osservato che l'aumento della durata della fase G1 di ceppi di lievito con la delezione di Sch9 può essere compensato da un'iperattivazione della chinasi A. Ciò suggerisce una sovrapposizione funzionale delle due vie, tuttavia la contemporanea delezione di Ras2 e Sch9 ha un effetto molto più pronunciato rispetto alle rispettive singole delezioni e ciò fa immaginare la maggiore complessità che caratterizza l'interazione tra le diverse vie di segnalazione cellulare coinvolte nella modulazione dell'invecchiamento.

È importante rimarcare ancora una volta che i mediatori che fanno parte di queste vie cellulari pro-invecchiamento trovano i loro orologi funzionali o strutturali negli eucarioti superiori ed è stato confermato che i meccanismi fin ora descritti sono conservati dal lievito fino ai mammiferi. Inoltre, è stato osservato che in tutti gli organismi questi percorsi di segnalazione sono influenzati dai nutrienti, direttamente o attraverso l'IGF e il GH per quanto riguarda gli eucarioti pluricellulari [52, 75].

Recentemente è stato descritto che la riduzione della sintesi degli sfingolipidi attraverso l'ipoespressione delle subunità dell'enzima serina-palmitoil-transferasi che catalizza il primo passo della sintesi degli sfingolipidi, o la sua inibizione farmacologica tramite l'inibitore specifico mioriocina, allunga la sopravvivenza delle colture e ne migliora la resistenza agli stress termici e ossidativi. L'effetto pro-aging, dipendente dagli sfingolipidi, è stato attribuito principalmente all'attivazione delle chinasi attivate dagli sfingolipidi Pkh1 e Pkh2, ortologhe della chinasi PDK1 (3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-1) dei mammiferi, che a loro volta attivano Sch9 tramite la fosforilazione sulla treonina 570, così come PDK1 attiva PKB [76]. La fosforilazione di Sch9 sul sito specifico delle Pkhs è stata inoltre correlata alla disponibilità di fonti di azoto ma senza chiarirne il meccanismo [77].

3. Modulazione dell'invecchiamento tramite i nutrienti

L'invecchiamento non è una malattia, ma come dice il biogerontologo Rafael De Cabo è il maggiore fattore di rischio per tutte le malattie croniche. Pertanto la medicina anti-invecchiamento è alla ricerca di interventi che possano migliorare lo stato di salute anche in età avanzata. Sulla base di studi epidemiologici si è osservato che determinati stili di vita e comportamenti adeguati insieme ad una dieta corretta possono avere un grande impatto sulla longevità. In particolare, oltre all'esercizio fisico, il consumo di alimenti contenenti ad esempio selenio, zinco, omega 3, vitamine C ed E, flavonoidi ed altre sostanze antiossidanti di cui sono ricchi i vegetali, ha un effetto benefico sulla salute durante l'invecchiamento [78].

In effetti, fino ad oggi, l'unico intervento riconosciuto capace di modulare l'invecchiamento prevenendo e ritardando l'insorgenza delle patologie età-correlate, compreso il cancro, è la restrizione calorica (Calorie Restriction, CR) intesa come la riduzione senza malnutrizione dell'introito calorico del 20-40% rispetto al consumo ad libitum [79].

La prima dimostrazione che la restrizione calorica sia in grado di aumentare la vita media e massima si deve a McCay che nel 1935 dimostrò un allungamento della vita dei topi mantenuti in restrizione calorica [80], i suoi risultati furono confermati da Weindruch negli anni ottanta quando fu inoltre osservato che la restrizione calorica era accompagnata da un calo dello stress ossidativo e dall'iperespressione di chaperonine con l'effetto di diminuire l'accumulo di danni a livello cellulare, mentre a livello sistemico si riduceva e si ritardava nel tempo l'incidenza di glomerulonefriti e di tumori [81-82].

Per quanto riguarda i mammiferi superiori sono stati condotti due studi rilevanti sulle scimmie. Il primo, realizzato al Wisconsin National Primate Research Center, ha rivelato che le scimmie sottoposte ad una restrizione calorica del 30% per 20 anni non solo mostrano una riduzione nella mortalità associata all'età almeno del 13%, ma anche una riduzione dei livelli di glucosio a digiuno e una migliore sensibilità all'insulina con una associata assenza di diabete di tipo 2, e ancora, bassi livelli di trigliceridi ed LDL con una conseguente riduzione del rischio cardiovascolare. Inoltre, l'incidenza di neoplasie, sarcopenia e atrofia cerebrale risultava sensibilmente ridotta [83]. Il secondo studio sulle scimmie, condotto dal NIA, non ha riscontrato un significativo aumento della sopravvivenza ma ha confermato l'effetto della restrizione calorica sulla riduzione delle patologie associate all'età [84]. Le discrepanze tra i due studi dipendono probabilmente da differenze nell'approccio metodologico, infatti il tipo di dieta usata dai due gruppi non è identica [85]. Sta di fatto che, sebbene sull'uomo non esistano ancora dati per quanto riguarda le variazioni nella durata della vita dipendenti dall'alimentazione, gruppi di individui che si sottopongono volontariamente alla restrizione calorica (CRonies) mostrano una significativa riduzione degli indicatori di rischio cardiovascolare (LDL, pressione arteriosa, glicemia a digiuno, proteina C reattiva) e sono protetti nei confronti dell'obesità e dell'insulino-resistenza [86-87].

88]. Altri studi a breve termine indicano che seguendo una dieta ipocalorica si riduce anche il danno al DNA [89].

L'impiego dei sistemi modello si è rivelato ancora una volta fondamentale per la comprensione dei meccanismi cellulari che intervengono nella risposta ai nutrienti ed ha già permesso di identificare alcuni dei mediatori coinvolti, e di cominciare ad avanzare delle ipotesi sulla possibilità di modularne l'attività nella direzione più favorevole variando la composizione della dieta.

In *C. elegans* i metodi a disposizione per determinare la riduzione dell'apporto calorico sono diversi. La maggiore estensione della sopravvivenza (100-150%) è raggiunta in totale assenza di batteri, che costituiscono la sola fonte di nutrienti per il nematode in coltura [90]. Le differenze nell'effetto sulla sopravvivenza che si osservano con i diversi metodi di restrizione calorica possono dipendere dalla diversa disponibilità dei differenti nutrienti che si ottiene con i vari metodi [91]. D'altra parte anche dagli esperimenti sulla *Drosophila* e sul lievito si evince che il tipo di nutrienti più che la quantità di calorie assunte abbia un effetto sulla durata della vita [92-93]. In particolare nel moscerino della frutta la componente proteica della dieta sembra essere la responsabile della riduzione della sopravvivenza [94-95] e in particolar modo l'aminoacido metionina è stato identificato come quello con maggiore effetto proaging [96-97]. Questo risultato è stato confermato anche nel topo, insieme agli aminoacidi triptofano e cisteina [98], e nel lievito insieme ad asparagina e glutammato [69, 99]. Nel modello murino gli animali che seguono la restrizione di metionina mostrano un incremento dell'età media del 42% e del 44% per l'età massima rispetto ai controlli che assumono anche la metionina, analoghi risultati si ottengono tramite protein e calorie restriction. La riduzione di metionina nella dieta si associa alla diminuzione dei livelli di specie reattive dell'ossigeno nei mitocondri e dello stress ossidativo, a bassi livelli di insulina e di IGF-1 e a bassa adiposità [85, 100].

Molti esperimenti dimostrano che la protezione mediata dalla CR, sia in *Drosophila* che in *C. elegans* e nel lievito, non dipende esclusivamente dalla via insulina/IGF-1 dipendente inizialmente già identificata quale mediatrice del segnale dei nutrienti nel controllo dell'invecchiamento. Infatti, mutanti in CHICO o FOXO1 continuano a

rispondere alla restrizione calorica, suggerendo che questi mediatori non siano gli unici responsabili dell'effetto dei nutrienti sulla sopravvivenza [90, 101, 102].

In *Saccharomyces cerevisiae* la riduzione nel mezzo di coltura sia del glucosio che degli aminoacidi promuove la sopravvivenza [103, 104]. È accettato che il segnale del glucosio passi principalmente attraverso Ras [105] mentre quello degli aminoacidi è ritenuto essere mediato principalmente da TOR ed Sch9 [106, 107]. Tuttavia la CR è in grado di duplicare la CLS anche in assenza di ras ed sch9 [64], quindi deve esserci un pathway alternativo. D'altra parte gli adattamenti metabolici che avvengono in cellule sottoposte a restrizione calorica sono numerosi e coinvolgono ad esempio anche il metabolismo lipidico, e poiché sappiamo che gli acidi grassi possono a loro volta attivare reti di segnalazione, questa potrebbe essere un'ulteriore via coinvolta nella modulazione dell'invecchiamento attraverso la trasduzione del segnale dei nutrienti [108].

Dunque in molti organismi l'effetto sulla longevità dovuto alla restrizione calorica supera quello ottenuto tramite manipolazioni genetiche e risulta essere indipendente dall'attivazione di una sola via di segnalazione. Questo suggerisce che modulare l'introito calorico, o meglio i nutrienti assunti con la dieta, possa consentire di controllare contemporaneamente, e con un intervento esterno relativamente semplice, diversi meccanismi cellulari che, sinergizzando tra loro, producono come effetto finale l'aumento della sopravvivenza e una migliore risposta agli stress che costituiscono rilevanti fattori di rischio nello sviluppo di patologie associate all'età. Inoltre non si hanno ancora chiari i possibili "effetti collaterali" della restrizione calorica sull'uomo, forse questi sarebbero evitati bilanciando tra loro i nutrienti senza privarsene.

SCOPO DELLA RICERCA

È noto che, in diversi organismi dal lievito fino ai mammiferi, la riduzione del 20-40% dell'introito calorico senza malnutrizione (Calorie Restriction, CR) è in grado di estendere la sopravvivenza, proteggere da stress di varia natura e prevenire l'instabilità genomica. Recentemente è stato osservato che anche la riduzione selettiva di specifici componenti della dieta (Dietary Restriction, DR) può avere un ruolo protettivo. Tuttavia, non è ancora completamente chiaro in che modo i diversi nutrienti influenzino la sopravvivenza né quale sia il loro rapporto con le vie di segnalazione che regolano l'invecchiamento. Questa ricerca intende far luce sui meccanismi che intervengono nella promozione dell'invecchiamento e che sono influenzati dalla disponibilità di specifici nutrienti.

Nello specifico gli obiettivi di questo studio sono stati:

- identificare i nutrienti che attivano la sensibilizzazione cellulare agli stress e promuovono l'invecchiamento,
- riconoscere quale sia il rapporto tra glucosio e aminoacidi nel meccanismo che compromette la protezione cellulare,
- individuare specifici aminoacidi la cui assenza è in grado di proteggere le cellule dagli stress e dall'invecchiamento,
- rintracciare quali pathway mediano l'effetto pro-aging di singoli aminoacidi,
- descrivere l'effetto dei nutrienti sul livello e l'attività di chinasi e fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione della resistenza agli stress e della longevità,
- chiarire il rapporto tra la disponibilità di determinati nutrienti e i geni dell'invecchiamento.

Saccharomyces cerevisiae rappresenta per la sua semplicità e versatilità un ottimo modello per scomporre l'effetto dei singoli componenti nutritivi e studiare la cascata di segnalazione attivata da ognuno. Poiché, la funzione di molti fattori coinvolti nella regolazione dell'invecchiamento e nella risposta ai nutrienti è conservata anche negli eucarioti superiori, le scoperte raggiunte grazie al lievito possono trovare riscontro nei mammiferi e suggerire modalità di intervento per la modulazione dell'invecchiamento anche nell'uomo.

MATERIALI E METODI

1. Terreni di coltura

YPD

1% estratto di lievito

2% peptone

2% glucosio

SDC

0.18% yeast nitrogen base

0.5% ammonio solfato

0.14% NaH_2PO_4

2% glucosio

0.08% mix aminoacidica appropriata

Il pH del terreno è portato a 6 con NaOH.

Le quantità standard dei componenti della mix aminoacidica sono riportate nella Tabella1.

Per produrre i terreni solidi è aggiunto agar al 2%.

Il terreno base (chiamato "AUXO") a cui sono aggiunti i singoli aminoacidi nel test di risposta ai nutrienti comprende yeast nitrogen base, ammonio solfato, NaH_2PO_4 e glucosio, inoltre, per compensare le auxotrofie del ceppo DBY746 e consentire la sintesi proteica, sono aggiunti anche uracile e gli aminoacidi leucina, triptofano e istidina in quantità 1X.

Tabella 1. Concentrazioni dei costituenti usati per supplementare i terreni sintetici. In **blu** sono evidenziati i componenti necessari a compensare le auxotrofie del ceppo DBY746 wild type.

Componente	mg/L
L-Istidina	80
L-Leucina	120
L-Triptofano	80
Uracile	80
Adenina	80
L-Acido aspartico	100
L-Acido glutammico	100
L-Arginina	40
L-Fenilalanina	60
L-Isoleucina	60
L-Lisina	60
L-Metionina	80
L-Serina	400
L-Tirosina	40
L-Treonina	200
L-Valina	150

2. Costruzione dei ceppi

I ceppi deleti sono ottenuti tramite la tecnica “one step gene disruption”[109].

La mutagenesi sito specifica su SCH9 è stata ottenuta usando i plasmidi PFR82 e pAM202 [110] tramite integrazione omologa.

Il tagging di Sch9 con emoagglutinina è stato ottenuto secondo la tecnica descritta da Longtine tramite il plasmide pFA6a-3HA-TRP1 [111].

Nella tabella di seguito è riportata la lista completa dei ceppi.

Tabella 2. Tabella dei ceppi utilizzati

Ceppo	Genotipo
DBY746	<i>MATα leu 2-3, 112 his3Δ1 trp1-289 ura 3-52 GAL⁺</i>
<i>ras2Δ</i>	DBY746 <i>ras2::LEU2</i>
<i>sch9Δ</i>	DBY746 <i>sch9::URA3</i>
<i>sch9-HAtag</i>	DBY746 <i>SCH9HAtag::TRP1</i>
<i>ras2Δsch9Δ</i>	DBY746 <i>ras2::LEU2 sch9::URA3</i>
T570A	DBY746 <i>SCH9^{T570A}</i>
T737A	DBY746 <i>SCH9^{T737A}</i>
<i>pkh2Δ</i>	DBY746 <i>pkh2::LEU2</i>
<i>pkh1^{ts}/2Δ</i>	DBY746 <i>pkh1^{ts::TRP1} pkh2::LEU2</i>
<i>gis1Δ</i>	DBY746 <i>gis1::HIS3</i>
<i>msn2,4Δ</i>	DBY746 <i>msn2::HIS3 msn4::LEU2</i>
<i>msn2,4Δ gis1Δ</i>	DBY746 <i>msn2::HIS3 msn4::LEU2 gis1::URA3</i>
<i>rim15Δ</i>	DBY746 <i>rim15::LEU2</i>
<i>Prototrophic</i>	
<i>Wine yeast</i>	
W303-1A	<i>MATα leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i>
	W303-1A <i>pkh1^{ts} pkh2::TRP1</i>
	W303-1A <i>sch9::URA3</i>
	W303-1A <i>SCH9-HAtag::TRP1</i>
	W303-1A <i>bcy1^{S145A}</i>
	W303-1A <i>pkh1^{ts} pkh2::TRP1 bcy1^{S145A}</i>
	W303-1A <i>sch9::URA3 bcy1^{S145A}</i>

3. Chronological life span

La Chronological Life Span (CLS) descrive la sopravvivenza di una popolazione di cellule in fase post mitotica. È possibile misurarla in terreno liquido o in situ, nel secondo caso è impedita l'eventuale ricrescita della coltura durante l'esperimento e l'accumulo di sostanze come etanolo e acido acetico.

CLS in terreno liquido. 1 ml di una coltura cresciuta over night viene diluita con SDC fresco fino a un volume finale di 10ml (1:10) in una fiasca coperta con un foglio di alluminio (con un rapporto coltura : fiasca di 1:5) e posta a 30°C in agitazione (200 rpm) per assicurare l'aereazione. Il momento della diluizione è considerato il giorno 0, successivamente, ogni 2 giorni, aliquote della coltura vengono diluite e piastrate su terreno YPD. Le piastre sono incubate a 30°C per 2-3 giorni e le colonie cresciute sono contate, il numero delle unità formanti colonie (CFU) ottenute a giorno 2 è considerato il 100% di sopravvivenza rispetto al quale saranno calcolate le percentuali di sopravvivenza dei giorni successivi.

CLS in situ [112]. Aliquote di una coltura liquida a giorno 2 di crescita di un ceppo trp- sono piastrate su diverse piastre di SDC senza triptofano e con la mix di aminoacidi desiderata. Le piastre sono incubate a 30°C e nessuna crescita si verifica a causa dell'assenza di triptofano. Ogni 2 giorni ad alcune piastre viene aggiunto il triptofano e sono riposte a 30°C perché comincino a dividersi. Dopo un paio di giorni vengono contate le colonie cresciute, il numero ottenuto a giorno 2 rappresenta il 100% di sopravvivenza.

4. Frequenza di mutagenesi

La frequenza di mutagenesi è valutata parallelamente alla sopravvivenza osservando la percentuale di cellule sopravvissute nel tempo che sviluppano resistenza alla canavanina [112]. Aliquote di cellule nei diversi giorni di coltura durante l'esperimento di CLS sono raccolte e lavate con acqua, quindi vengono piastrate su terreno sintetico addizionato con 60 mg/ml di canavanina e non contenente arginina (che competerebbe con la canavanina per il sistema di trasporto), soltanto le cellule che hanno subito una mutazione a livello del gene

CAN1 saranno in grado di formare una colonia. La frequenza di mutagenesi è espressa come cellule canavanina resistenti per 10^6 cellule vive.

5. Test di resistenza allo stress ossidativo e termico

La resistenza allo shock termico è stata misurata piastrando su terreno completo delle spot di diluizioni seriali delle colture in fase stazionaria e incubando a 55°C per 60-120 minuti o a 30°C per il controllo. Dopo lo shock le piastre sono trasferite a 30°C e incubate per 2-3 giorni.

Per saggiare la resistenza allo stress ossidativo, delle aliquote di cellule in fase stazionaria sono diluite in tampone K-fosfato 0.1M, pH6, e trattate con differenti concentrazioni di perossido di idrogeno per 30 minuti. Quindi vengono fatte delle diluizioni seriali che sono inoculate su piastre di terreno YPD che vengono incubate a 30°C per 2-3 giorni.

6. Test di risposta ai nutrienti

Il test di risposta ai nutrienti, messo a punto nel nostro laboratorio, misura la risposta allo stress ossidativo di colture in fase stazionaria esposte ad una determinata mix di nutrienti per un periodo di 4h al fine di valutare la capacità di tali nutrienti di sensibilizzare o meno allo stress. Una coltura che ha raggiunto la fase stazionaria in terreno sintetico completo viene suddivisa in aliquote da 1ml in una piastra multi-pozzetto. La piastra viene centrifugata a 3500 rcf per 20 minuti, i pellet vengono risospesi nei diversi terreni freschi di cui si vuole osservare l'effetto e la piastra viene incubata in agitazione a 30°C per 4 ore. Al termine dell'incubazione i terreni sono rimossi e le cellule sono risospese in tampone K-phosphate 0.1M, pH6 e trattate con perossido di idrogeno per 30 minuti. Spot da ogni pozzetto sono piastrate su terreno YPD, le piastre vengono incubate a 30°C per 2-3 giorni. La maggior densità della spot corrisponderà ad una maggiore resistenza ottenuta con il trattamento corrispondente. Per una valutazione quantitativa più precisa, aliquote da ogni pozzetto sono diluite e piastrate su terreno YPD e dopo il tempo necessario alla crescita le colonie formatesi sono

contate, il numero di colonie che derivano dalle colture incubate col terreno controllo “auxo” è fissato come 100% rispetto al quale sono calcolate le percentuali di cellule resistenti sottoposte alle altre condizioni. Di seguito è rappresentato uno schema delle fasi del test.

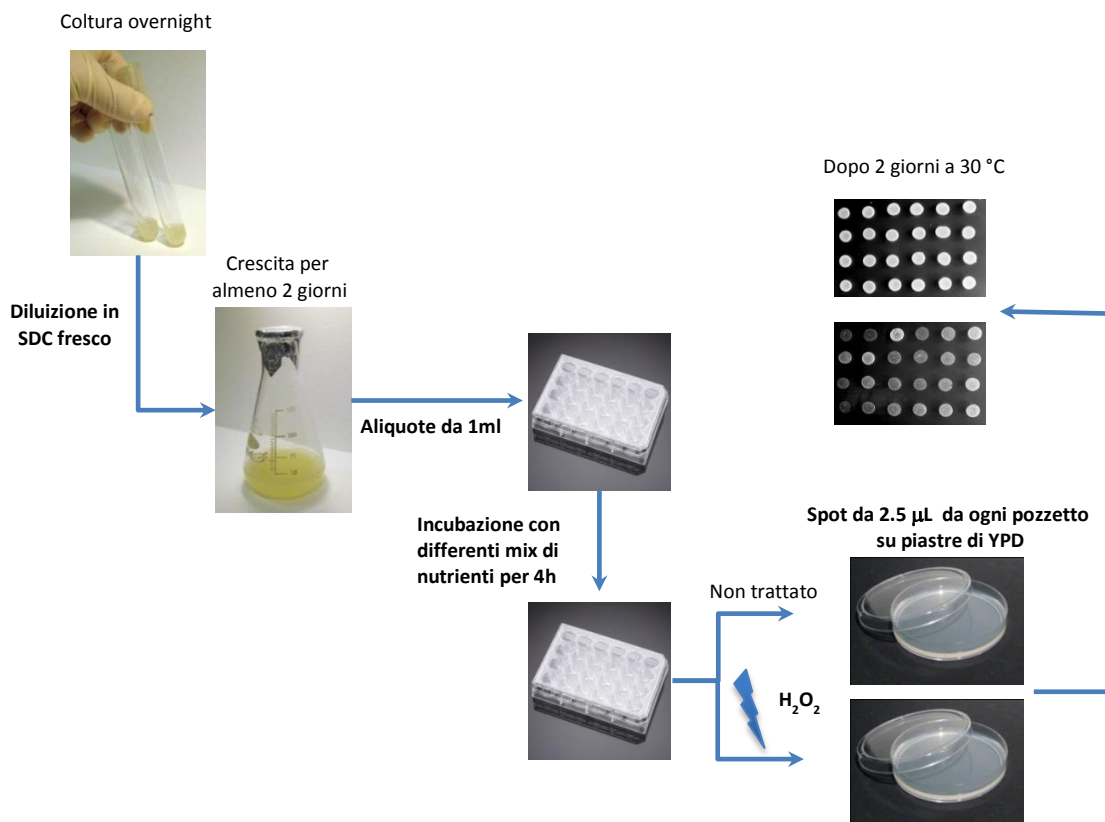


Figura 7. Schema del test di risposta ai nutrienti usato per determinare l'effetto di singoli o miscele di nutrienti sulla resistenza agli stress in fase stazionaria

7. Estrazione delle proteine e analisi immunologica

Gli estratti proteici sono preparati attraverso lisi meccanica delle cellule tramite biglie di vetro in buffer di estrazione (50 mM MES KOH pH6.2, 0.05 mM EDTA, 0.1 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 1X Protease inhibitor mix (Sigma), 1 mM PMSF, 25mM NaF, 10mM NaN₃, 10mM sodium beta-glycero-phosphate, 10mM Na₂H₂P₂O₇). Il lisato viene centrifugato a 5000 rpm per 15 minuti e il supernatante viene conservato per le analisi successive. La concentrazione delle proteine viene determinata tramite saggio di Bradford.

Le proteine vengono sottoposte a SDS-PAGE [113]. Le proteine separate nel gel sono trasferite su membrane di nitrocellulosa (Schleicher & Schuell) usando il buffer di trasferimento 192mM glicina, 25mM Tris, 20% metanolo nella cella di trasferimento Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Biorad). La membrana viene immersa per 1 ora in soluzione di bloking 1% albumina di siero bovino (BSA) in 20 mM Tris, 0.5M NaCl, pH7.5 (TBS), lavata in TBS con lo 0.05% di Tween-20 (TBST) e incubata tutta la notte con l'anticorpo primario. Successivamente la membrana viene lavata in TBST e incubata per 2 ore con l'anticorpo secondario (AP o HRP coniugato), quindi viene lavata in TBS e sviluppata con BCIP/NTB (Promega) o con il substrato chemoluminescente (Invitrogen).

8. Estrazione dell'RNA e PCR quantitativa

La coltura a giorno 3 di crescita è stata suddivisa in aliquote da 7ml dalle quali è stato rimosso il terreno esaurito per il trasferimento nei terreni freschi contenenti i nutrienti da testare. Dopo il tempo di incubazione stabilito (1-6 ore) le cellule sono state raccolte e l'RNA totale è stato isolato usando il kit RiboPure-Yeast (Ambion). L'RNA è stato trattato con DNase I RNase-free (Promega) per rimuovere le contaminazioni di DNA genomico. 0.5 µg di RNA totale sono stati retrotrascritti in cDNA usando la trascrittasi inversa ImProm-II (Promega) con primers sequenza-specifici (Tabella 3). La PCR quantitativa è stata eseguita con lo strumento StepOne Real-Time PCR instrument (Applied Biosystems) usando la Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) e i primers specifici (Tabella 3). I parametri dell'amplificazione sono stati: 95 °C per 20 secondi seguiti da 40 cicli di 3 secondi a 95 °C e 30 secondi a 60 °C. L'espressione relativa dei geni è stata calcolata usando il metodo $2^{-\Delta\Delta CT}$ e normalizzata con i livelli di espressione del gene ACT1.

Tabella 3. Lista dei primers usati per la retrotrascrizione e la PCR Real Time

Gene	Primers retrotrascrizione	Primers real time forward	Primers real time reverse
ACT1	gaatccaaaacaataccagtag	tcgtgctgtcttcccatctatc	gtagaaggtagtgatgccagatc
SOD2	agctgctaatttaaccaagaag	ctccgggtcaaatcaacgaat	ccttggccagaagatctgag
RIM15	ttatcgtactttcatcgtcac	ggagctggaactggacggcaag	agcatgtctgtggccttttgaa

9. Microscopia

Le cellule trasformate con Rim15 fusa alla GFP (Green Fluorescent Protein) e/o Pab1 fusa con la RFP (Red Fluorescent Protein) sono state fatte crescere fino alla fase stazionaria, trattate con le diverse mix di nutrienti e sono state osservate a differenti tempi al microscopio a fluorescenza senza fissazione.

I nuclei sono stati colorati con 0.5ug/ml di Hoechst 33342 (Invitrogen) per 15 minuti prima dell'osservazione per ottenere la colorazione corrispettiva al DAPI. Per l'osservazione è stato usato il microscopio a fluorescenza Olympus BX50 utilizzando i filtri appropriati.

10. Test della Beta-galattosidasi

Il pellet derivante da 1 ml di cultura, che ha subito il trattamento con i vari nutrienti, è stato lisato in tampone "low salt" (50mM Tris pH7.5, 0.1X protease inhibitor cocktail (Sigma), 100mM NaCl, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 50mM NaF). La concentrazione proteica del lisato è stata determinata tramite saggio di Bradford. 55 µl di campione adeguatamente diluito è stato mescolato a 85 µl di soluzione substrato (1.1mg/ml ONPG in 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM 2-mercaptoethanol, pH7.0). Quindi è stata letta l'assorbanza a 420 nm ogni 5 minuti fino a 30 minuti dall'inizio della reazione. La percentuale di attività nelle diverse condizioni è stata calcolata rispetto alla condizione di controllo (auxo) stabilita come 100% di attività.

11. Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata mediante test T di Student a due code per gruppi di valori con diversa varianza, paragonando le diverse condizioni saggiate ai propri controlli.

RISULTATI

1. Aminoacidi e destrosio agiscono attraverso pathway distinti

Per comprendere il ruolo di singoli nutrienti nella protezione cellulare e nell'invecchiamento, abbiamo sviluppato un protocollo che misurasse le variazioni di resistenza allo stress ossidativo di cellule di lievito in fase stazionaria in seguito all'esposizione a diverse miscele di nutrienti (Test di risposta ai nutrienti, per maggiori dettagli vedi la sezione Materiali e metodi).

In primo luogo, è stato saggiato l'effetto sulla resistenza allo stress ossidativo del terreno sintetico completo di tutti gli aminoacidi rispetto al terreno che contiene solo gli aminoacidi essenziali (auxo) a diverse concentrazioni di destrosio. Il terreno controllo "auxo" ha in comune con il terreno completo, oltre a NaH_2PO_4 , le fonti di azoto diverse dagli aminoacidi in quantità non limitanti (yeast nitrogen base e ammonio solfato) e i costituenti supplementari uracile, leucina, istidina e triptofano, necessari per consentire la sintesi proteica poiché compensano le auxotrofie del ceppo di laboratorio utilizzato nella maggior parte degli esperimenti (DBY746), manca però di tutti gli altri aminoacidi normalmente presenti nel terreno completo (vedi la Tabella 1 nella sezione Materiali e metodi).

In accordo con osservazioni precedenti [70, 114], è risultato che la resistenza allo stress ossidativo aumenta con la riduzione dal 2% allo 0.5% della concentrazione di destrosio, inoltre, destrosio ed aminoacidi hanno un effetto sinergico nella sensibilizzazione allo stress ossidativo. Lo stesso esperimento è stato confermato nel ceppo isogenico prototrofico e nel ceppo di lievito naturale impiegato comunemente dalle industrie vinifere (Fig. 8A). L'effetto sensibilizzante dell'esposizione a destrosio e aminoacidi sulla resistenza allo stress ossidativo si ripete anche nel background genetico W303-1A e per quanto riguarda la resistenza allo shock termico (Fig. 8B e 8C), e va di pari passo con la diminuzione della sopravvivenza cronologica, misurata sia con il protocollo standard sia in situ per eliminare l'eventuale ricrescita e l'accumulo di metaboliti come l'acido acetico e l'etanolo (Fig. 8D). Inoltre, per escludere la possibilità che parte dell'effetto fosse dovuto ad un cambiamento di pH, l'esperimento è stato condotto sia a pH 6 (che è il valore di pH del terreno fresco) che a pH 3.7 (che è il valore di pH mediamente raggiunto dalle colture in fase stazionaria), e il risultato è stato ancora una volta confermato (Fig. 8E).

Per identificare gli effettori della sensibilizzazione glucosio- e aminoacidi-dipendente, è stata monitorata la resistenza allo stress ossidativo dopo l'esposizione a diverse miscele di nutrienti, di ceppi di lievito isogenici in cui è stata creata la delezione dei due mediatori chiave del segnale dei nutrienti: RAS2 ed SCH9. I prodotti di entrambi i geni sono noti modulatori dell'attività della PKA che inibisce la risposta allo stress in diverse maniere. Nello specifico Ras2 è essenziale per l'attivazione della PKA dipendente dal glucosio, mentre Sch9 è in grado di fosforilare la subunità regolatrice della PKA in risposta all'attivazione di TOR1 ritenuto il mediatore del segnale aminoacidico [115].

Anche nel ceppo *ras2Δ* l'esposizione agli aminoacidi è in grado di aumentare la sensibilità allo stress ossidativo così come nel ceppo wild type, mentre il glucosio da solo ha un effetto minore. Di contro il ceppo *sch9Δ* risponde ancora al glucosio, ma questo effetto non è potenziato dalla contemporanea presenza degli aminoacidi. È inoltre da notare che l'esposizione ai soli aminoacidi non è in grado di sensibilizzare le cellule al trattamento con perossido di idrogeno in nessuno dei background genetici osservati (Fig. 8F). Pertanto, possiamo affermare che: mentre Ras2 ha un ruolo maggiore nella risposta glucosio-dipendente, Sch9 è necessario per la risposta dipendente dagli aminoacidi. Questi risultati suggeriscono che aminoacidi e destrosio agiscono attraverso pathway distinti, tuttavia, poiché la presenza del glucosio è necessaria perché si verifichi la sensibilizzazione dipendente dagli aminoacidi, le due vie devono probabilmente agire su effettori a valle comuni.

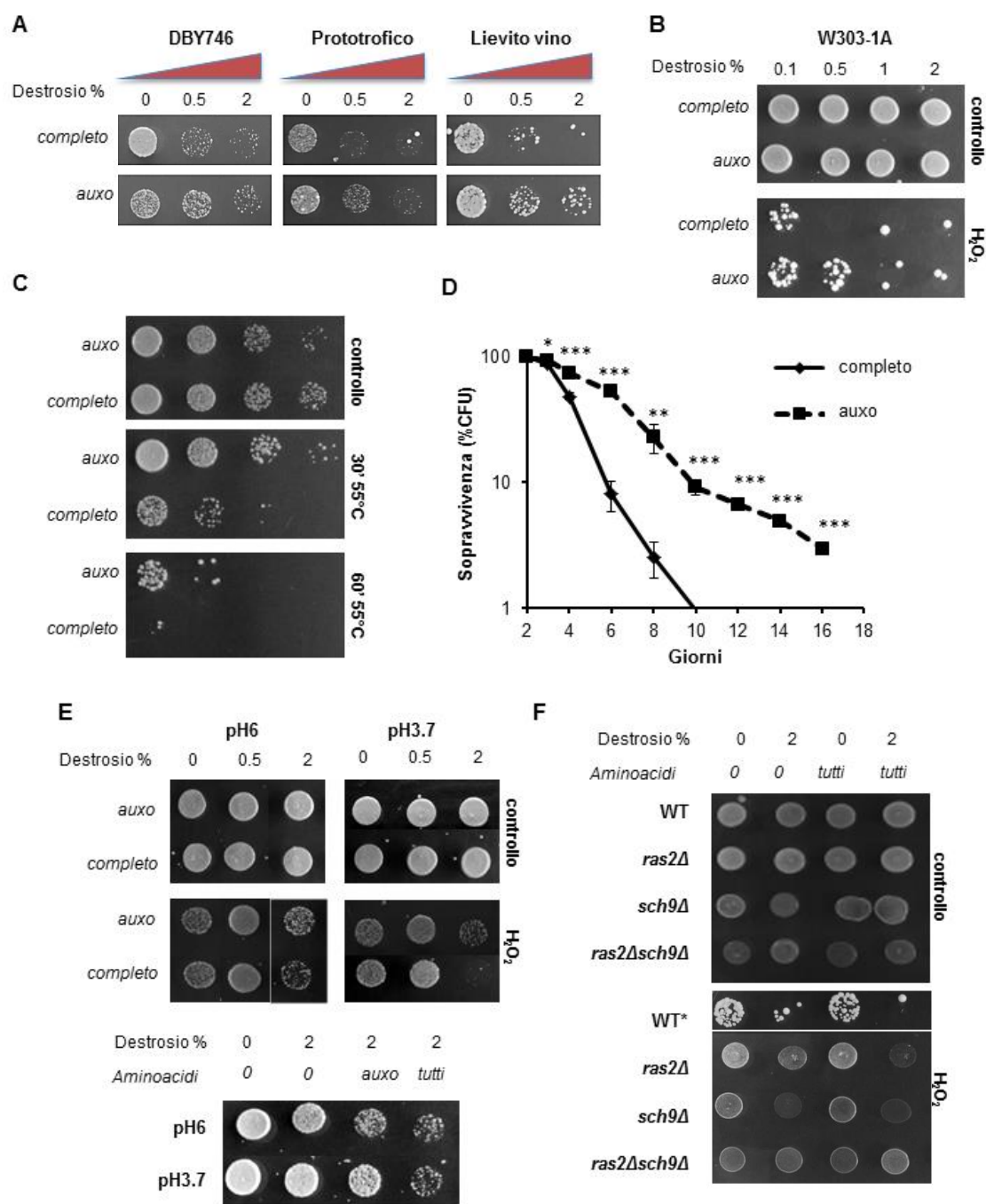


Figura 8. Aminoacidi e destrosio agiscono attraverso pathway distinti

(A) Resistenza allo stress da perossido di idrogeno di cellule in fase stazionaria del ceppo di laboratorio DBY746 wild type, del DBY746 prototrofico e del lievito impiegato per la vinificazione dopo l'esposizione ai nutrienti indicati per 4 h.

(B) Resistenza allo stress ossidativo del ceppo di lievito W303-1A esposto per 4 h in fase stazionaria ai nutrienti indicati.

(C) Resistenza allo shock termico del ceppo di lievito DBY746 wild type a giorno 2 di crescita dopo 4h di esposizione ai nutrienti indicati.

(D) CLS in situ del ceppo DBY746 in presenza di tutti aminoacidi o solo di quelli necessari per compensare le auxotrofie del ceppo. I dati rappresentano la media \pm l'errore standard di 5 differenti esperimenti. * $p=0.2$, ** $p<0.05$, *** $p<0.005$.

(E) Test di risposta ai nutrienti dei ceppi DBY746 wild type (pannello superiore) e prototrofico (pannello inferiore) a pH 6 o pH 3.7.

(F) Test di risposta ai nutrienti dei mutanti indicati, isogenici del ceppo DBY746. *Il ceppo wild type è stato fatto crescere sulla piastra per tre giorni, gli altri per un giorno.

Tutte le mix di nutrienti contengono i componenti base del terreno sintetico (yeast nitrogen base, ammonio solfato e fosfato); in "auxo" sono aggiunti solo i componenti necessari a compensare le auxotrofie del ceppo DBY746 (istidina, triptofano, leucina, uracile), la mix "completo" contiene anche tutti gli altri aminoacidi del terreno SDC e l'adenina; la concentrazione di destrosio è specificata per ogni condizione, dove non è indicata, è la concentrazione standard (2%).

2. Tor1 e Pkh1/2 convergono su Sch9

Considerato il ruolo centrale di Sch9 nella risposta agli aminoacidi, nella risposta agli stress e nell'invecchiamento, abbiamo studiato la sua regolazione da parte delle chinasi a monte per identificare il meccanismo che collega specifici nutrienti alla sua attività. La regolazione delle AGC chinasi, della cui famiglia Sch9 è un membro, avviene principalmente tramite la fosforilazione su due residui aminoacidici a livello del T-loop e del motivo idrofobico (HM) che per Sch9 sono rispettivamente la treonina 570 e la treonina 737. Il primo sito è target delle chinasi Pkh1/2, ortologhe della chinasi PDK1 di mammifero, il secondo sito viene fosforilato dal complesso TORC1 (Fig. 9A). Il western blot, eseguito usando l'anticorpo specifico per Sch9 fosforilato in posizione 570, ha confermato che la perdita di funzione delle chinasi Pkhs, o la sostituzione della treonina 570 con il residuo non fosforilabile adenina, causano la scomparsa della banda corrispondente, confermando le osservazioni precedenti sulla relazione tra Sch9 e le Pkhs, ottenute usando l'inibitore delle Pkhs miriocina o mutanti deficitari nella sintesi degli sfingolipidi [77].

Le mutazioni puntiformi che provocano le sostituzioni aminoacidiche T570A e T737A, ottenute tramite mutagenesi sito diretta, portano ad un aumento della resistenza agli stress e della sopravvivenza rispetto al ceppo che reca Sch9 wild

type (Fig. 9C e 9D). Il fenotipo dei due mutanti puntiformi si avvicina a quello del ceppo *sch9Δ*, in misura maggiore per quanto riguarda il mutante *sch9-T570A*, rivelando un ruolo più importante per la resistenza agli stress e per l'invecchiamento per il sito target delle Pkhs.

Analogamente, le cellule in cui la funzione di Pkh1 e Pkh2 è compromessa mostrano una maggiore sopravvivenza ed una maggiore resistenza agli stress ossidativo e termico rispetto ai loro controlli, sia nel ceppo DBY746 che nel W303-1A (Fig. 10A-10D). La misurazione della sopravvivenza cronologica del ceppo wild type e del ceppo in cui l'allele di Pkh1 è reso termosensibile e quello di Pkh2 è nullo, condotta a 35°C per inattivare Pkh1 (come precedentemente descritto [77]), va nella stessa direzione dei risultati della resistenza allo stress. Questi primi dati confermano il ruolo del metabolismo degli sfingolipidi nella longevità e nella resistenza agli stress.

Successivamente, abbiamo valutato la risposta allo stress ossidativo dei due mutanti puntiformi di Sch9 dopo l'esposizione a differenti miscele di nutrienti (Fig. 10E). Ciò ha confermato che la regolazione di Sch9 è uno step cruciale di integrazione dei segnali provenienti da Pkh1/2 e TOR1 in risposta agli aminoacidi ed ha evidenziato che Pkh1 e Pkh2 sono fondamentali non solo nell'invecchiamento ma anche nella risposta agli aminoacidi, poiché la perdita del loro sito di fosforilazione su *sch9* rende il ceppo mutato meno sensibile all'effetto degli aminoacidi rispetto a quanto accade per il mutante in cui è perso il sito fosforilabile da TOR1.

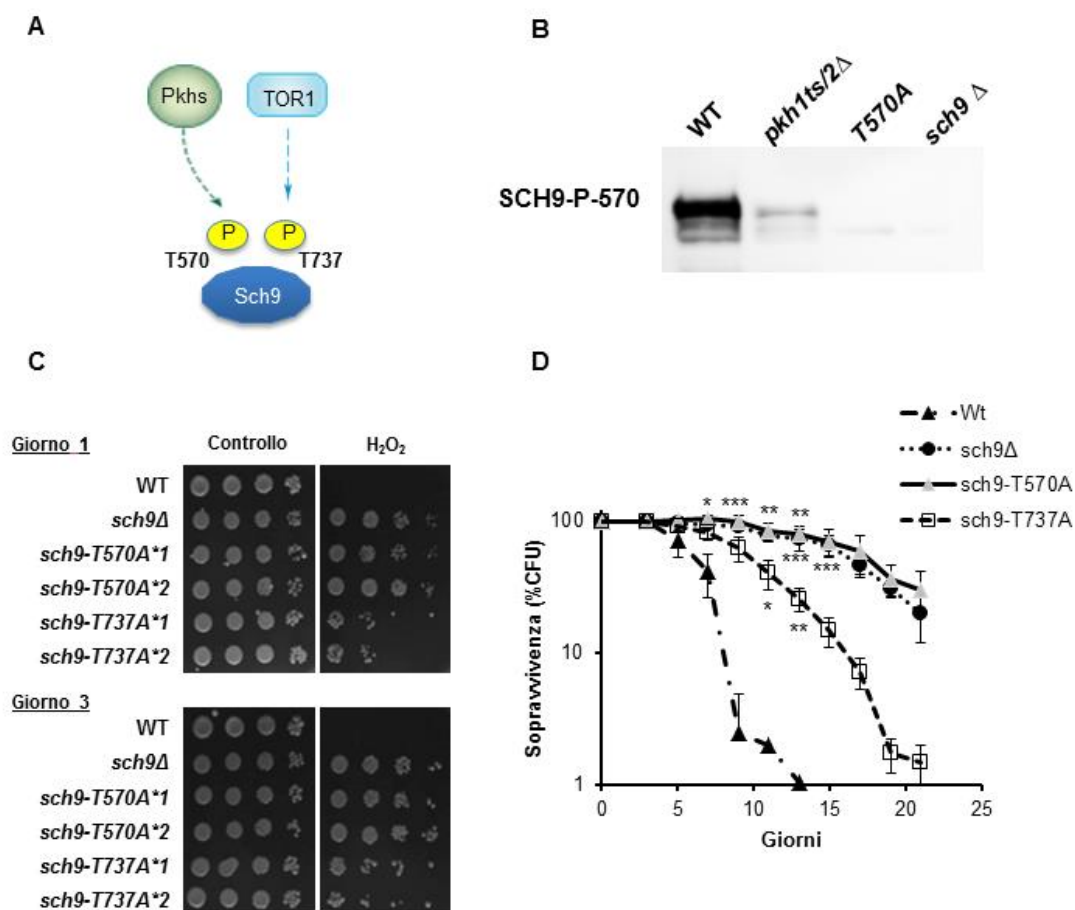


Figura 9. Ruolo dello stato di attivazione di Sch9 nella sopravvivenza e nella resistenza agli stress

(A) Schema dell'attivazione della chinasi Sch9.

(B) Western blot dell'estratto proteico totale dei ceppi DBY746 wt, *pkh1tsphk2Δ*, *sch9-T570A*, *sch9Δ*. L'anticorpo primario usato è anti-SCH9-P570.

(C) Resistenza allo stress ossidativo del ceppo DBY746 wt e dei suoi derivati isogenici indicati dopo 1 o 3 giorni di crescita in SDC. *1 e *2 indicano due differenti isolati con lo stesso genotipo rilevante.

(D) CLS dei ceppi indicati. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

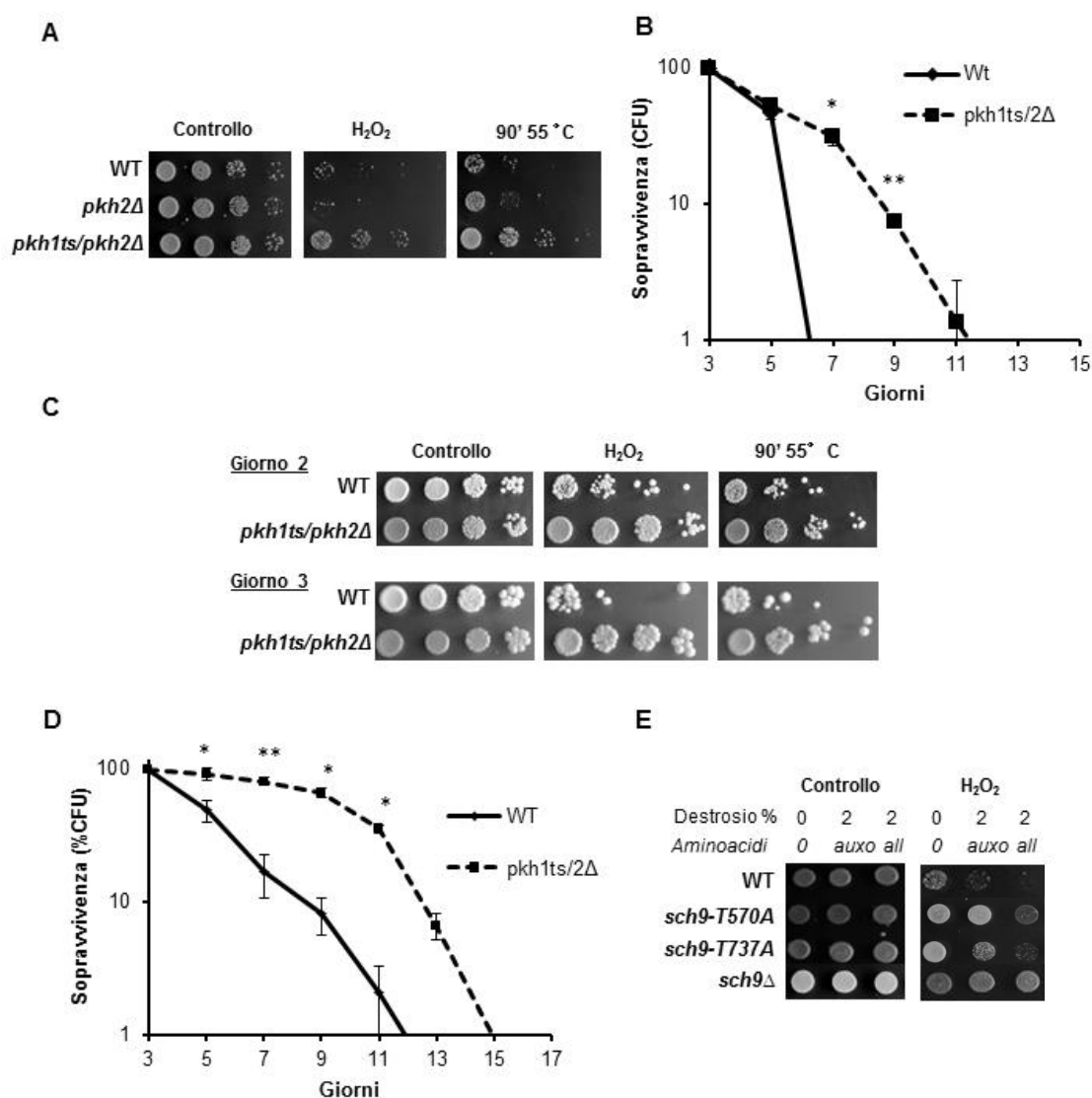


Figura 10. Ruolo delle Pkhs nella sopravvivenza, nella resistenza agli stress e sull'attivazione di Sch9

(A) Resistenza allo stress ossidativo e termico del ceppo DBY746 o (C) W303-1A e dei loro derivati isogenici a giorno 2 di crescita.

(B) CLS del ceppo DBY746 o (D) W303-1A e dei loro derivati isogenici. Dopo due giorni di crescita a 30°C, le colture sono state trasferite a 35°C per inattivare l'allele termosensibile di Pkh1. L'esperimento è stato condotto in triplicato e i dati rappresentati sono la media ± l'errore standard.

(B) * $p < 0.02$, ** $p < 0.005$. (D) * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$.

(E) Test di risposta ai nutrienti dei derivati del ceppo DBY746 che portano gli alleli di SCH9 wt, mutati (con le sostituzioni aminoacidiche T570A o T737A) o nullo.

3. Specifici aminoacidi diminuiscono la resistenza agli stress e la sopravvivenza attraverso vie di segnalazione differenti

Verificato l'importante ruolo degli aminoacidi nella sensibilizzazione agli stress e nella sopravvivenza, abbiamo voluto identificare quali tra gli aminoacidi presenti nella mix completa fossero i principali responsabili di tale effetto. Per fare ciò abbiamo misurato la resistenza allo stress ossidativo di cellule di lievito wild type esposte in fase stazionaria a terreni contenenti il terreno controllo "auxo", destrosio al 2% e un aminoacido per volta in concentrazione 1X. Dopo il trattamento con acqua ossigenata, piccole aliquote da ogni campione sono state inoculate come spot su piastre di terreno ricco e dopo due giorni di crescita a 30°C sono state contate le unità formanti colonie (CFU). Il numero di CFU ottenute dal campione con il terreno "auxo" è stato preso come riferimento (100% di cellule resistenti) e i valori degli altri campioni sono stati rapportati a questo come percentuali ($CFU/CFU(auxo)*100$). Gli aminoacidi serina, treonina e valina sono risultati essere gli aminoacidi che determinano una minore resistenza all'acqua ossigenata rispetto al controllo (Fig. 11A). Allo stesso modo sono state testate mix di diversi aminoacidi confermando l'effetto maggiore di serina, treonina e valina e in misura minore di acido glutammico e metionina (Fig. 11B).

Per comprendere il legame tra specifici aminoacidi e l'attivazione di Sch9 attraverso la fosforilazione del T-loop e del dominio HM, abbiamo comparato la sensibilizzazione allo stress ossidativo dipendente dai singoli aminoacidi in presenza/assenza dell'inibitore delle Pkhs miriocina. Abbiamo scoperto che la miriocina annulla la sensibilizzazione serina-dipendente ma non l'effetto del trattamento con treonina, valina o metionina (Fig. 12A). Dosi crescenti di miriocina sono risultate in grado di revertire l'effetto della serina presente anche ad alte concentrazioni (5X) (Fig. 12B).

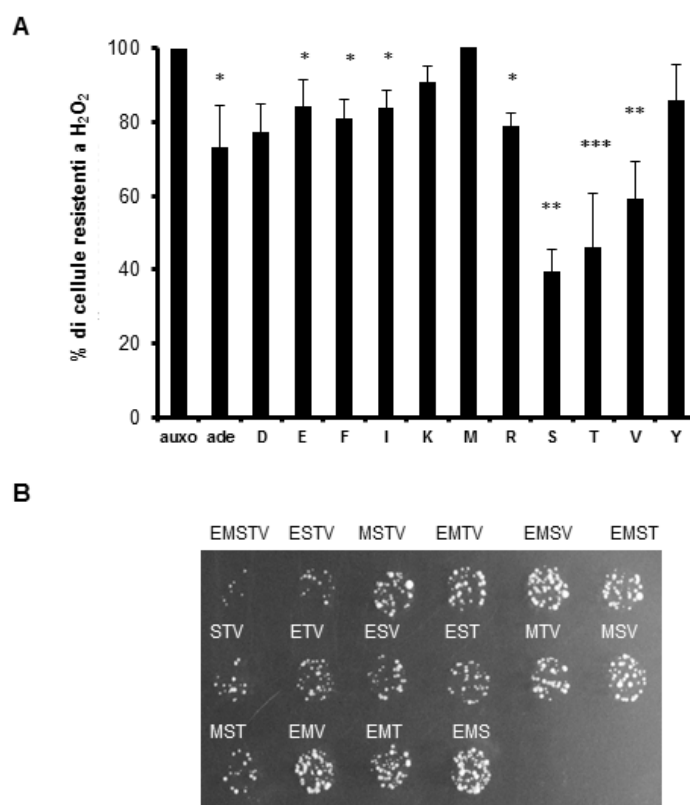


Figura 11. Ruolo dei singoli aminoacidi nella sensibilizzazione allo stress ossidativo

(A) Test di risposta ai nutrienti del ceppo DBY746 wt. I dati rappresentano la media \pm l'errore standard di 5 esperimenti indipendenti. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$, *** $p < 0.001$.

(B) Effetto di varie mix di aminoacidi sulla resistenza allo stress ossidativo.

Gli aminoacidi sono indicati con il codice internazionale ad una lettera.

Il coinvolgimento del pathway delle Pkhs nella risposta alla serina è stato confermato ulteriormente osservando la risposta alla serina nel ceppo che overesprime o non esprime gli alleli funzionanti delle Pkhs (Fig. 12C). Inoltre, sia l'overespressione di Sch9 che dell'ortologo umano delle Pkhs, PDK1, aumenta la sensibilizzazione dovuta alla serina (Fig. 12D), suggerendo una conservazione del ruolo delle chinasi ortologhe di PDK1 negli eucarioti inferiori e superiori. Infine, tramite western blot abbiamo dimostrato che la fosforilazione su Sch9 in posizione 570 dipende dalla presenza della serina nel mezzo di coltura, che aumenta tale fosforilazione, mentre la rimozione della serina la diminuisce, senza variazione nella quantità di Sch9 (Fig. 12E).

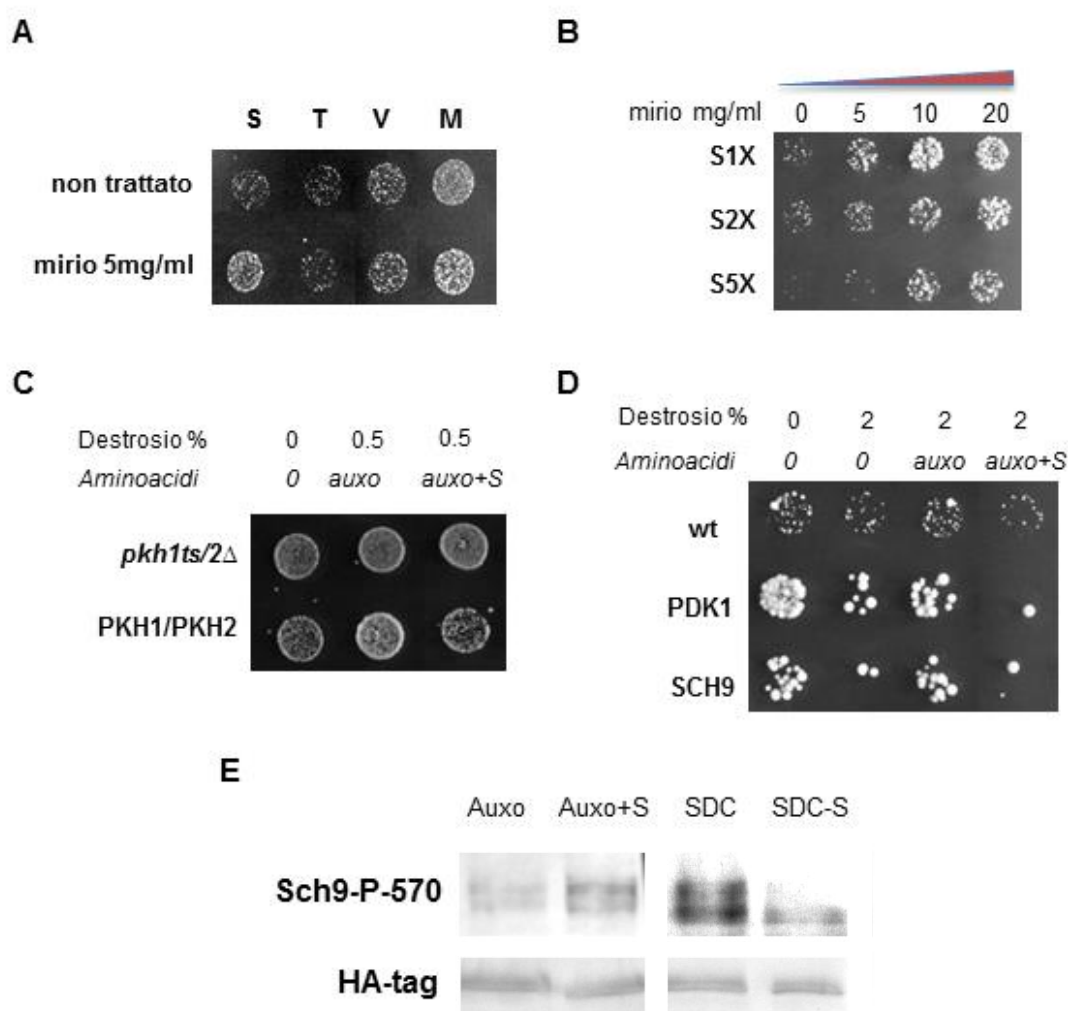


Figura 12. La sensibilizzazione serina-dipendente agisce attraverso le Pkhs

(A) Test di risposta alle mix di nutrienti indicate in presenza/assenza dell'inibitore delle Pkhs miriocina.

(B) Resistenza allo stress ossidativo in fase stazionaria dopo l'esposizione a diverse concentrazioni di serina insieme a dosi crescenti di miriocina.

(C) Test di risposta ai nutrienti di cellule che esprimono l'allele termosensibile di Pkh1 e quello nullo di Pkh2 (*pkh1ts/2Δ*) e che overesprimono i due alleli wt (PKH1/PKH2).

(D) Test di risposta ai nutrienti del ceppo DBY746 e dei ceppi corrispondenti che overesprimono l'ortologo di mammifero delle Pkhs (PDK1) o SCH9.

(E) Effetto della presenza/assenza della serina nel mezzo di coltura sulla fosforilazione di Sch9 in posizione 570. Gli estratti provengono da cellule in fase esponenziale cresciute in presenza delle mix di nutrienti indicate. La quantità di Sch9 totale è stata determinata grazie all'anticorpo primario anti-HA sugli estratti provenienti dal ceppo W303-1A che esprime Sch9 fuso al tag di emoagglutinina trattato nelle stesse condizioni utilizzate per testare la fosforilazione.

4. Treonina e valina attivano la via di segnalazione pro-invecchiamento TOR/S6K-dipendente

Per capire in che modo Tor1 costituisca il link tra gli aminoacidi pro-aging, l'attivazione di Sch9 e la sensibilizzazione cellulare, abbiamo esaminato l'effetto dei singoli aminoacidi, identificati come i più efficaci nella sensibilizzazione cellulare, in presenza o in assenza della rapamicina che è in grado di inibire TORC1 in maniera specifica. Abbiamo osservato che la rapamicina è in grado di sopprimere la sensibilizzazione causata dagli aminoacidi treonina e valina, singolarmente o in combinazione, ma non è capace di sopprimere l'effetto serina dipendente (Fig. 13A e 13B). Anche in questo caso l'effetto osservato non è influenzato dal pH (Fig. 13C e 13D). In aggiunta, l'inserzione della mutazione puntiforme T737A all'interno del dominio idrofobico della chinasi Sch9 è capace di abolire la sensibilizzazione allo stress ossidativo dovuta alla somministrazione di treonina o valina, ma è inefficace nei confronti della sensibilizzazione serina-dipendente (Fig. 13E). Questi risultati confermano che, mentre la sensibilizzazione allo stress ossidativo causata dalla serina è mediata dall'attivazione di Sch9 attraverso Pkh1 e Pkh2, quella dipendente da treonina e valina converge ugualmente su Sch9 ma su un sito diverso la cui fosforilazione dipende da Tor1.

Il ruolo pro-invecchiamento dei tre aminoacidi identificati è stato confermato anche tramite la misurazione della sopravvivenza cronologica, infatti, l'aggiunta al terreno base "auxo" di serina, treonina o valina alla concentrazione standard accorcia significativamente la sopravvivenza del ceppo wild type (Fig. 14A e 14B). Per di più, è molto interessante il fatto che, la crescita in terreno sintetico standard completo, ristretto per uno solo dei tre aminoacidi identificati (1:10 della concentrazione standard), è sufficiente sia ad aumentare la sopravvivenza, sia a ridurre il tasso di insorgenza di mutazioni spontanee (Fig. 14C e 14D). Ciò sottolinea l'effetto dell'esposizione a determinati nutrienti non solo sulla modulazione dell'invecchiamento, ma anche sulla capacità di favorire o meno l'insorgenza di mutazioni che nelle cellule degli eucarioti superiori sono alla base della trasformazione tumorale.

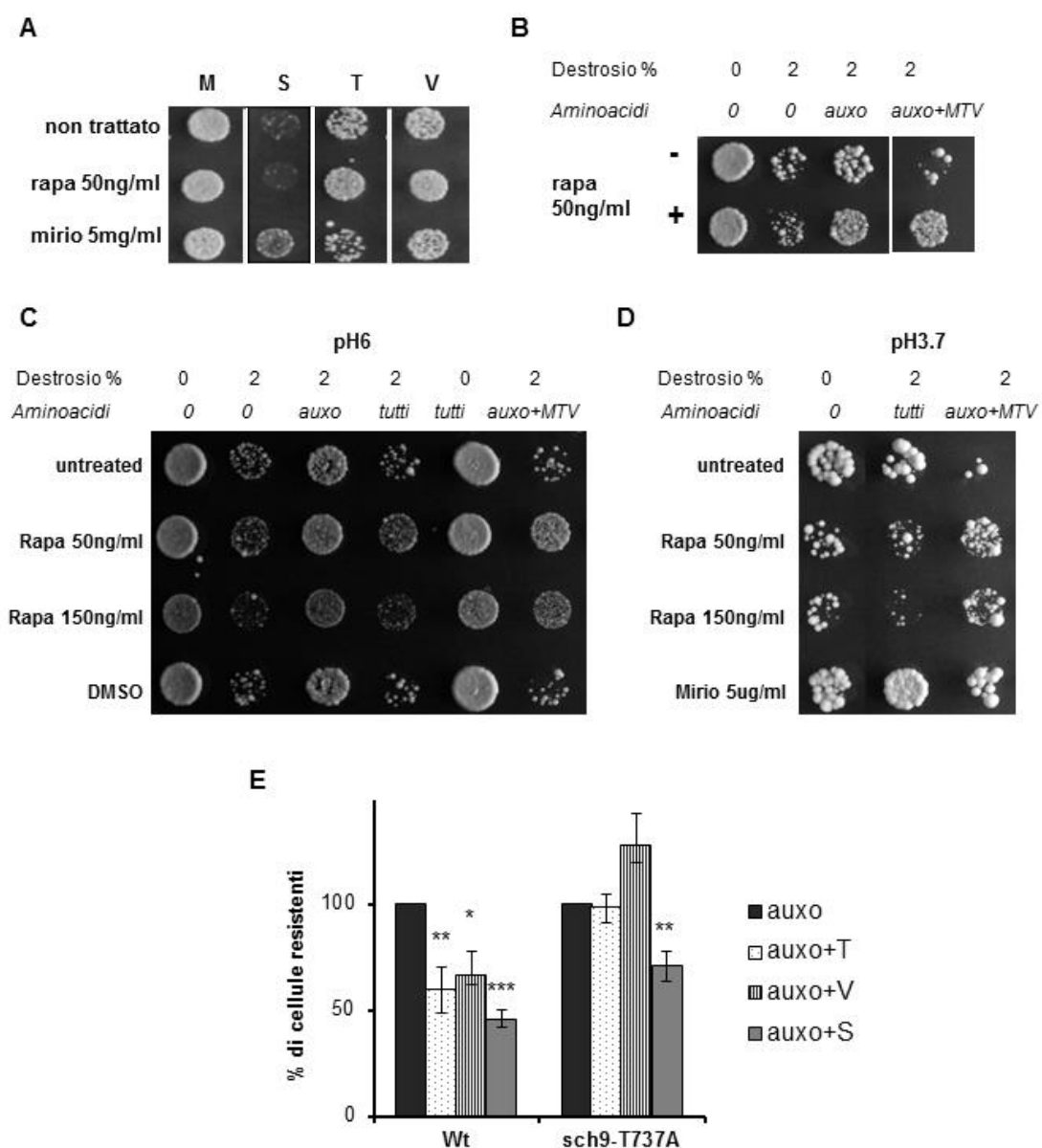


Figura 13. Ruolo di Tor/S6K nella risposta agli aminoacidi

(A) Test di risposta ai singoli aminoacidi o (B) alle mix di aminoacidi indicati del ceppo DBY746 in presenza/assenza dell'inibitore di Tor1 rapamicina o dell'inibitore delle Pkhs miriocina.

(C) Test di risposta ai nutrienti in presenza della rapamicina a differenti concentrazioni, o della stessa quantità di solvente utilizzato per solubilizzare la rapamicina (DMSO).

(D) Effetto di rapamicina e miriocina a pH acido.

(E) Test di risposta ai nutrienti del ceppo DBY746 e del corrispondente mutante Sch9-T737A.

* $p < 0.1$, ** $p < 0.02$, *** $p < 0.001$. Ogni condizione è stata paragonata al valore della condizione "auxo" per lo stesso ceppo che è stato fissato come 100% di resistenza.

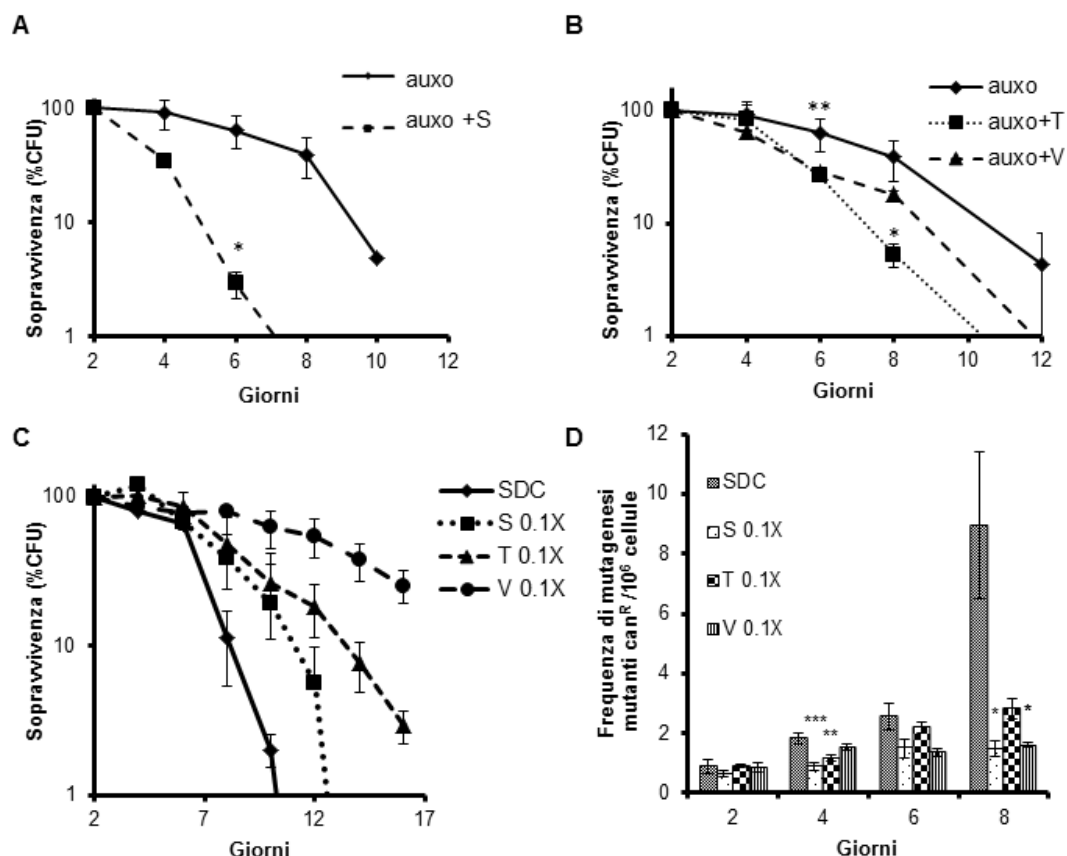


Figura 14. Ruolo di singoli aminoacidi su CLS e frequenza di mutagenesi

(A) CLS del ceppo di lievito DBY746 cresciuto in presenza (auxo+S) o in assenza di serina (auxo) alla concentrazione standard. * $p < 0.002$.

(B) Effetto della presenza di treonina (auxo+T) o valina (auxo+V) alla concentrazione standard sulla CLS del ceppo di lievito DBY746 rispetto alla loro assenza (auxo). * $p < 0.1$, ** $p < 0.005$.

(C ed E) CLS e frequenza di mutagenesi del ceppo DBY746 wild type cresciuto nel mezzo completo (SDC) o in SDC con concentrazioni 0.1X degli aminoacidi serina, treonina o valina. * $p < 0.1$, ** $p < 0.04$, *** $p < 0.02$.

Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato ed è riportata la media \pm l'errore standard.

5. La sensibilizzazione cellulare aminoacidi-dipendente coinvolge la regolazione di Rim15 e dei fattori di trascrizione a valle

È noto che la regolazione dell'invecchiamento attraverso i pathway Ras2/PKA e TOR1/Sch9 converge sulla proteina chinasi Rim15 [65]. Rim15 è in grado di attivare nel nucleo i fattori di trascrizione Msn2/4 e Gis1 che avviano l'espressione dei geni sotto il controllo degli elementi STRE (Stress Responsive Elements) e PDS (Post Diauxic Shift), che ne contengono i promotori, e che sono importanti nella

risposta agli stress e nella sopravvivenza [63, 66, 116-117]. Il trasloco dal citoplasma al nucleo e l'attività di Rim15 sono però impediti quando i due pathway pro-aging sono attivi. Abbiamo quindi pensato che fosse probabile che il meccanismo che determina la sensibilizzazione delle cellule di lievito agli stress e l'accorciamento della sopravvivenza, in seguito all'esposizione a destrosio e aminoacidi, coinvolgesse questo importante fattore. Pertanto, abbiamo voluto osservare la localizzazione di Rim15 tramite un plasmide codificante per la chinasi stessa fusa con la Green Fluorescent Protein (GFP) in diverse condizioni.

Monitorando nel tempo (da 1 a 6 ore) la localizzazione di Rim15 nelle cellule wild type a giorno 2 di crescita durante la riesposizione ai nutrienti, abbiamo osservato una rilocalizzazione di Rim15 a livello di alcuni granuli citoplasmatici, seguita da una diminuzione della fluorescenza nel tempo (Fig. 15A). L'assenza di Sch9, nelle cellule che hanno subito la delezione del gene, determina, invece, la localizzazione nucleare di Rim15 in fase stazionaria anche dopo l'esposizione al terreno fresco contenente destrosio e tutti gli aminoacidi (SDC) (Fig. 15A e 15B). Quindi Sch9 è determinante per la localizzazione di Rim15 e la sua attivazione è necessaria nella mediazione del segnale dei nutrienti.

La comparsa dei granuli si verifica anche in seguito all'aggiunta di serina, treonina e valina singolarmente al terreno minimo "auxo" (Fig. 15A). La contemporanea colorazione dei nuclei con il DAPI conferma che i granuli sono distinti dal nucleo (Fig. 15B).

Per caratterizzare ulteriormente la natura dei granuli abbiamo trasformato le cellule wild type già contenenti Rim15-GFP, con un plasmide che esprime la proteina Pab1 fusa alla Red Fluorescent Protein (RFP). Pab1 è un marker specifico dei granuli di stress. Questi sono degli aggregati di mRNA, proteine implicate nel processo di traduzione, heat shock proteins e fattori coinvolti nella segnalazione cellulare. Il loro assemblaggio è spesso promosso, durante uno stress come l'heat shock, dall'accumulo di proteine che non sono andate incontro ad un corretto folding. Sono coinvolti principalmente nella regolazione della traduzione, ma è stato ipotizzato un loro ruolo anche nel processo apoptotico, inoltre, il sequestro di determinati fattori all'interno dei granuli di stress potrebbe essere un meccanismo per variare il livello di specifiche reazioni all'interno della cellula [118, 119].

Osservando la doppia fluorescenza nelle cellule a giorno due di crescita dopo due ore di incubazione con tutti i nutrienti, è stato possibile affermare che tale trattamento causa la colocalizzazione di Rim15 con Pab1 a livello dei granuli di stress (Fig. 15C). Infine, per determinare se la diminuzione di fluorescenza, dopo una prolungata esposizione ai nutrienti, fosse dovuta ad una degradazione della proteina o alla riduzione dell'espressione, abbiamo misurato la quantità di RNA messaggero di Rim15 rispetto alla proteina Act1 a diversi tempi di trattamento tramite Real Time PCR. Il risultato ha mostrato una riduzione nel tempo dei livelli di espressione di Rim15 (Fig. 15D). Pertanto, possiamo concludere che il meccanismo che determina la sensibilizzazione delle cellule di lievito agli stress e l'accorciamento della loro sopravvivenza in seguito all'esposizione a destrosio e specifici aminoacidi, dipende da Sch9 e coinvolge l'attività di Rim15 attraverso la regolazione della sua localizzazione e della sua espressione.

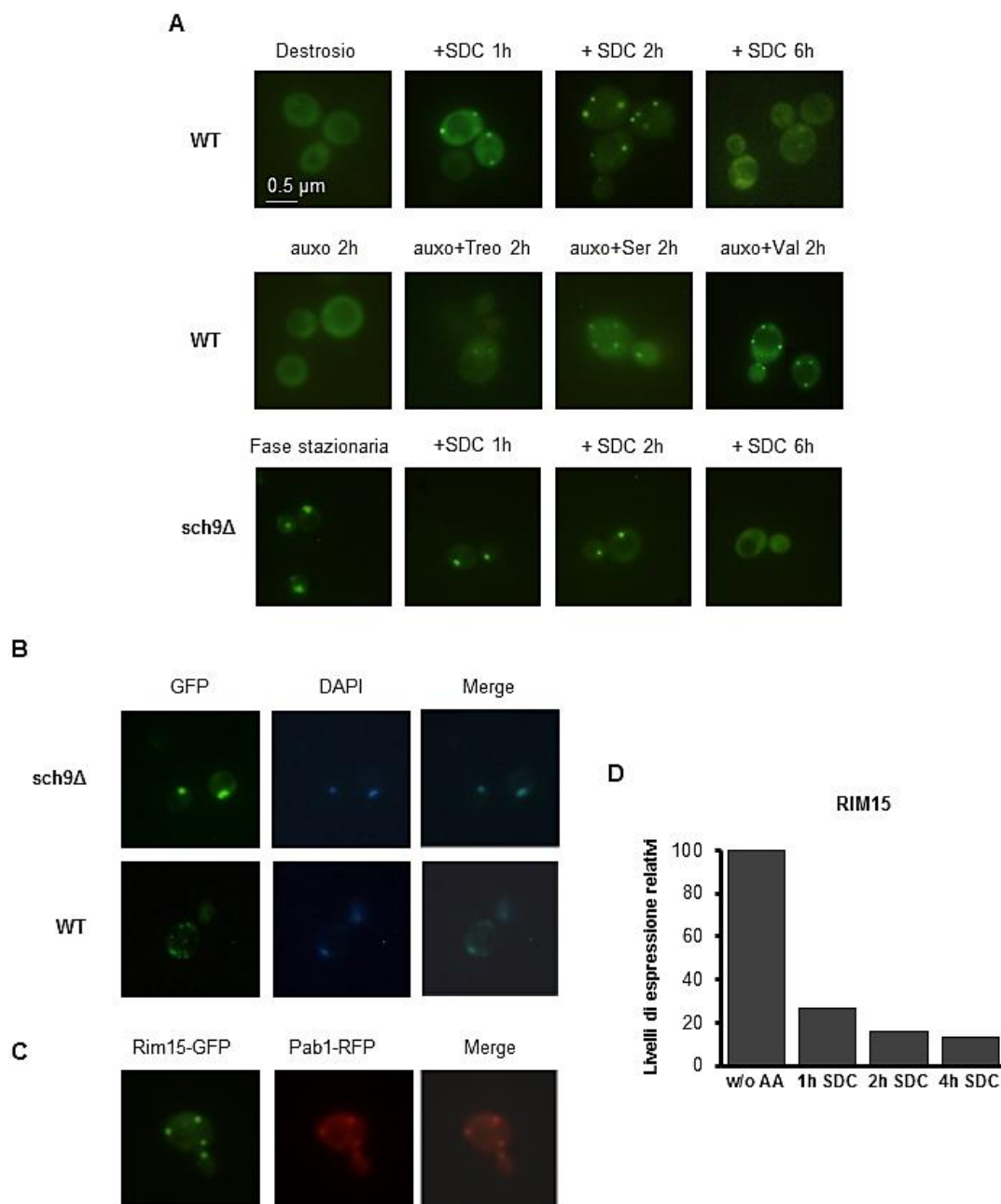


Figura 15. Gli aminoacidi influenzano l'attività di Rim15

(A) I ceppi DBY746 wild type ed *sch9Δ*, trasformati con il plasmide che codifica per la proteina di fusione Rim15-GFP, dopo due giorni di crescita in SDC, sono stati incubati con terreno SDC fresco completo di tutti gli aminoacidi o contenente soltanto i componenti specificati, la fluorescenza è stata osservata ai tempi indicati.

(B) Fluorescenza dei ceppi DBY746 wild type ed *sch9Δ*, trasformati con il plasmide che codifica per la proteina di fusione Rim15-GFP. Dopo due giorni di crescita in SDC le cellule wild type sono state trasferite in terreno SDC fresco mentre quelle *sch9Δ* sono state lasciate nel terreno esausto. La fluorescenza con i filtri per la GFP o per la colorazione DAPI è stata osservata dopo 2 ore di incubazione con i terreni sopra menzionati.

(C) Il ceppo DBY746 wild type, co-trasformato con i plasmidi che esprimono Rim15-GFP e Pab1-RFP, dopo due giorni di crescita in SDC, è stato trasferito in terreno SDC fresco, e la fluorescenza è stata osservata dopo 2 ore di incubazione.

(D) Livelli di espressione di Rim15 dopo vari tempi di incubazione con terreno completo fresco in fase stazionaria, espressi come percentuale rispetto al tempo zero (w/o AA) cioè prima del trasferimento nel terreno fresco (100% di espressione). I livelli di mRNA sono stati normalizzati rispetto all'actina scelta come controllo interno.

Considerato che i nutrienti agiscono da importanti modulatori di Rim15, che è a sua volta il regolatore centrale dei fattori di trascrizione a valle, abbiamo testato l'effetto sulla resistenza allo stress ossidativo dei nutrienti su ceppi isogenici di lievito che portano le delezioni di tali fattori di trascrizione, singolarmente o in combinazione. L'esperimento ha evidenziato un ruolo centrale per Rim15 e per i fattori di trascrizione Msn2/4, mentre la contemporanea delezione di Msn2/4 e Gis1 causa una sensibilizzazione simile a quella osservata nel mutante *rim15Δ* (Fig. 16A). Il ceppo con la singola delezione di Gis1 mostra una inaspettata alta resistenza allo stress ossidativo, ciò può essere spiegato, come mostra il test della beta-galattosidasi sul ceppo *gis1Δ* (Fig. 16B), dalla maggiore attivazione dell'elemento STRE probabilmente dovuta ad un'attivazione compensatoria di Msn2/4 in presenza dell'allele nullo di Gis1.

Per misurare direttamente l'effetto dell'esposizione ai nutrienti sull'attività dei fattori di trascrizione Msn2/4 e Gis1 abbiamo eseguito il test della beta-galattosidasi in varie condizioni di nutrienti. Questo metodo permette di sottoporre l'espressione dell'enzima beta-galattosidasi direttamente sotto il controllo degli elementi STRE o PDS, in questo modo, ogni volta che nella cellula saranno attivi i fattori di trascrizione specifici per questi elementi, sarà espresso e sintetizzato anche l'enzima; misurando l'attività dell'enzima sul substrato attraverso una reazione colorimetrica, si potrà avere una misura dell'attivazione dei geni sotto il controllo di STRE e PDS. I dati ottenuti mostrano che in seguito all'esposizione ai nutrienti l'attività di entrambi gli elementi risulta inibita, in particolare PDS sembra essere regolato negativamente da serina, treonina e valina (Fig. 16C).

La quantificazione, mediante Real Time PCR, dei livelli di espressione di uno dei geni STRE e PDS dipendenti, SOD2 che codifica per la superossido dismutasi, dimostra che l'aggiunta degli aminoacidi causa una riduzione dei livelli di RNA messaggero ma solo in presenza della chinasi Rim15 (Fig. 16D), confermando il ruolo della somministrazione degli aminoacidi nel controllo dell'espressione dei geni necessari alla risposta agli stress.

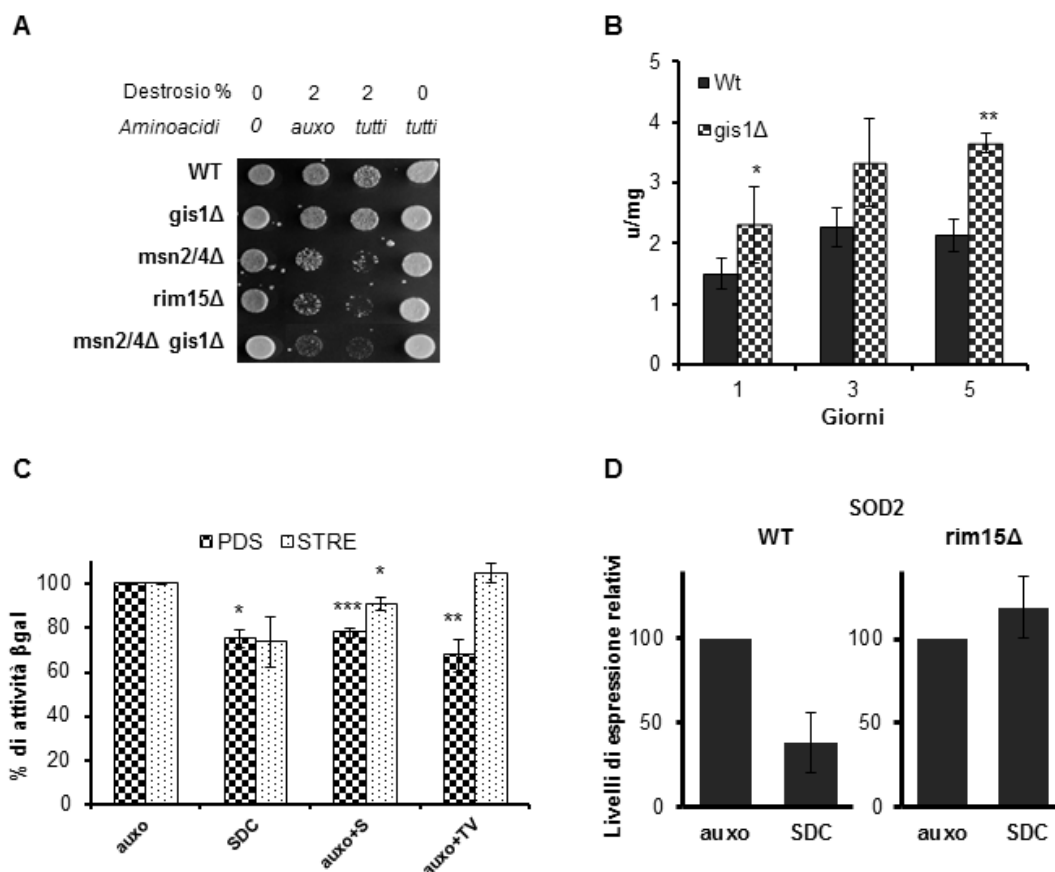


Figura 16. Gli aminoacidi influenzano i geni di risposta allo stress e i loro fattori di trascrizione in maniera Rim15-dipendente

(A) Test di risposta ai nutrienti del ceppo DBY746 e dei mutanti isogenici indicati.

(B) Attività STRE LacZ dei ceppi isogenici indicati. L'esperimento è stato condotto in triplicato. Le barre indicano l'errore standard. * $p=0.1$, ** $p<0.01$.

(C) Test della beta-galattosidasi dei reporter STRE e PDS. Gli estratti proteici testati derivano da colture del ceppo DBY746 in fase stazionaria incubato per 4h con le mix di nutrienti indicate. I dati mostrati sono la media di tre esperimenti indipendenti \pm l'errore standard. * $p<0.5$, ** $p<0.05$, *** $p<0.01$.

(D) Livelli di espressione del gene SOD2 nei ceppi DBY746 wt e Rim15Δ incubati a giorno 3 di crescita con terreno fresco contenente la mix completa di aminoacidi (SDC) o solo quelli essenziali

(auxo). I livelli di mRNA sono stati normalizzati rispetto all'actina scelta come controllo interno. La condizione auxo è stata fissata come riferimento (100% di espressione) e il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ è stato applicato. I dati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti \pm l'errore standard.

6. Coinvolgimento della PKA nella trasduzione del segnale dipendente dagli aminoacidi

Il legame tra il segnale glucosio-dipendente e l'attivazione della proteina chinasi A tramite Ras è stato a lungo approfondito [103, 105]. Alcune evidenze mettono in risalto anche la possibile connessione tra il segnale proveniente da aminoacidi ed altre fonti di azoto e l'attivazione della PKA. Ad esempio, Flo11, uno dei geni attivati dall'insufficienza di azoto [120], è influenzato anche dall'attività della PKA [121]. Altri studi hanno suggerito una possibile dipendenza del sistema di trasporto degli aminoacidi, che coinvolge la permeasi GAP-1, dallo stato di attivazione della PKA [122-123]. Infine, Bcy1, la subunità regolatrice della PKA, modulata dalla concentrazione di cAMP in risposta alla disponibilità di glucosio, viene fosforilata anche da TORC1 attivo [115], mentre le subunità catalitiche sono target fosforilabile delle chinasi Pkh [77]. Insieme, queste osservazioni descrivono dei possibili meccanismi di integrazione tra il segnale proveniente dagli aminoacidi e quello dipendente dal glucosio a livello della PKA.

Alcuni degli esperimenti da noi effettuati nell'ambito di questo lavoro rafforzano questo concetto. In particolare sono due i meccanismi tramite i quali lo stato di attivazione della proteina chinasi A può essere modulato influenzando la risposta ai nutrienti: l'inibizione da parte di Bcy1 e la composizione dell'oloenzima per quanto riguarda le subunità catalitiche.

Abbiamo, infatti, osservato che rendere la PKA iperattiva attraverso la sostituzione di BCY1 con gli alleli mutati BCY1-R142S o BCY1-R142M, i cui prodotti mostrano una minore affinità nei confronti delle subunità catalitiche, riduce o annulla la differenza nella resistenza allo stress ossidativo dovuta alla presenza o meno degli aminoacidi, mentre la sensibilizzazione dipendente dal glucosio continua a manifestarsi (Fig. 17A). Analogamente in seguito alla delezione delle subunità catalitiche Tpk1 e Tpk3, che produce una PKA attiva composta da 2 subunità Tpk2,

il ceppo mutato non solo diventa più resistente agli stress ossidativo e termico (Fig. 18A), ma non è più in grado di attivare la sensibilizzazione dipendente dagli aminoacidi. Anche il mutante *tpk1/2Δ* non risponde più, l'unico che mostra ancora una risposta è il mutante *tpk2/3Δ* suggerendo che sia la subunità Tpk1 ad essere indispensabile nella risposta al segnale aminoacidico (Fig. 17B).

D'altra parte la delezione, in particolar modo, della subunità catalitica 3 comporta un notevole aumento di resistenza agli stress (Fig. 18A) da essere in grado di revertire anche il fenotipo sensibile dovuto alla mancata regolazione negativa della PKA da parte della subunità regolatrice mutata (Fig. 18B).

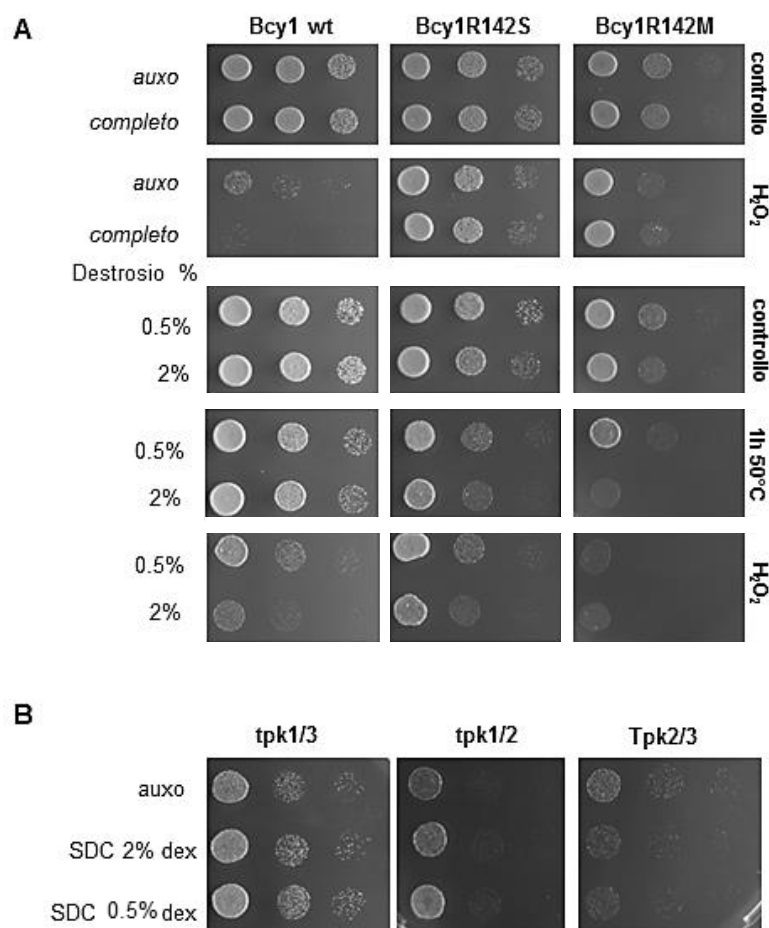


Figura 17. La risposta ai nutrienti è influenzata dallo stato di attivazione della PKA

(A) Test di risposta ai nutrienti dei mutanti di Bcy1 indicati.

(B) Test di risposta ai nutrienti in presenza di diverse isoforme della PKA.

La quantificazione di Bcy1, tramite analisi western blot con l'anticorpo specifico per Bcy1, in diversi background genetici, conferma che Sch9 è in grado di regolare Bcy1, e rivela che anche l'attività delle Pkhs influisce sia sulla quantità che sullo stato di fosforilazione di Bcy1 (rappresentato dalla comparsa di una ulteriore banda più pesante) (Fig. 18C). Il ceppo mutato su Bcy1 è stato adottato come controllo positivo, poiché la mutazione che comporta la sostituzione della serina in posizione 145 con un residuo di alanina rende Bcy1 più stabile [124].

La relazione tra la via Ras2/PKA e il metabolismo degli sfingolipidi è suggerita anche dal fatto che la delezione di Sjl2, un enzima che defosforila i fosfatidilinositolo-fosfati [125], protegge nei confronti di un'attivazione incontrollata della PKA a causa della presenza di Ras^{val19}, che è l'ortologo della forma oncogenica di Ras nei mammiferi (Ras^{val12}). Sorprendentemente, questo effetto è potenziato dall'assenza di serina nel mezzo di coltura, come se un'ulteriore compromissione del metabolismo dei lipidi interferisse con l'attività della PKA (Fig. 18D).

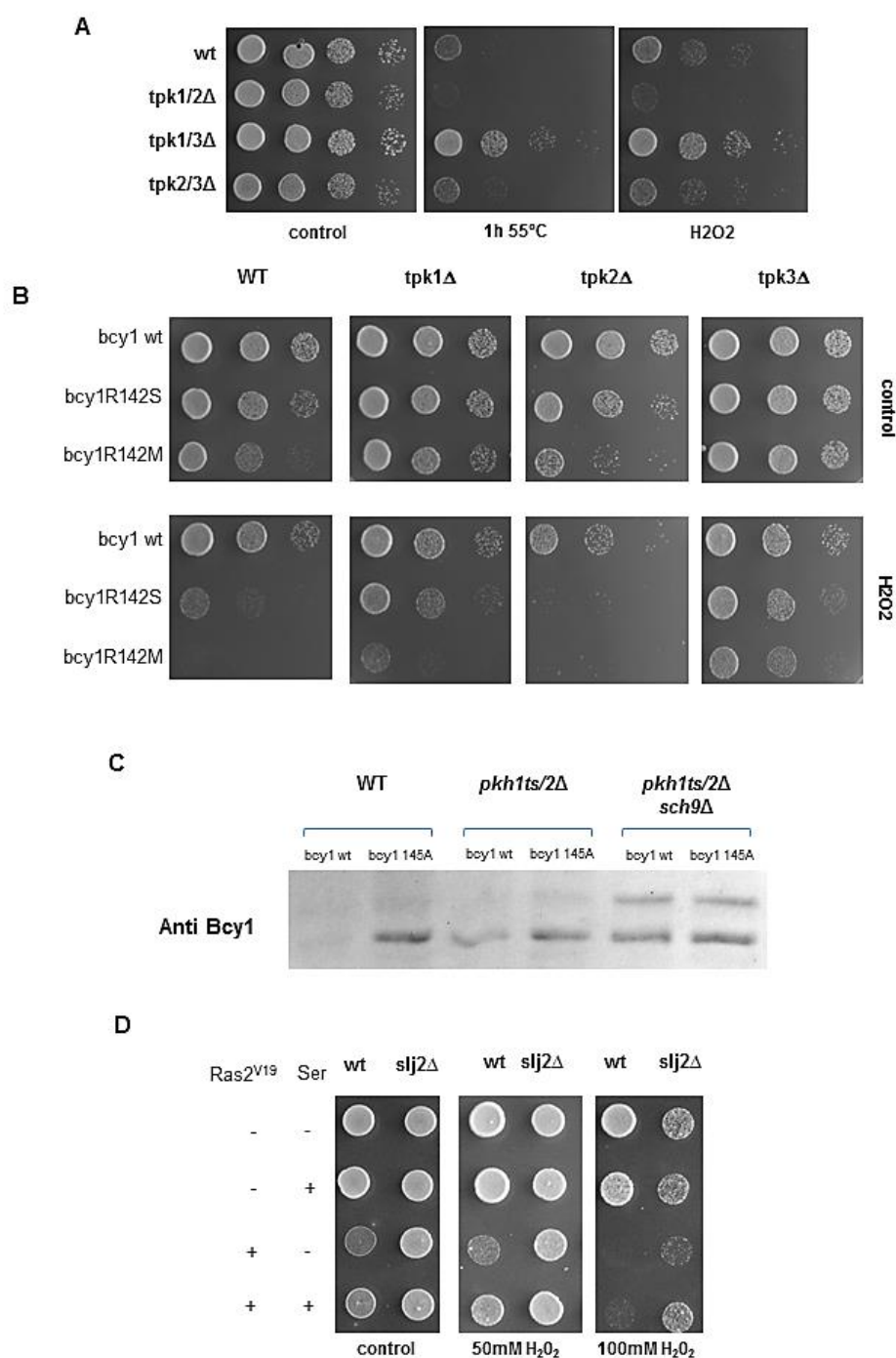


Figura 18. Effetto delle delezioni delle Tpk sulla resistenza agli stress e interazione tra PKA e pathway degli sfingolipidi

(A e B) Resistenza allo stress ossidativo e termico dei ceppi indicati.

(C) Western blot dell'estratto proteico totale dei ceppi W303-1A wt, *pkh1ts**pkh2Δ*, *pkh1ts**pkh2Δ**sch9Δ* con Bcy1 wt o mutato. L'anticorpo primario usato è anti-BCY1.

(D) Effetto della delezione di *Sjl2* e dell'assenza di serina sulla sensibilizzazione allo stress ossidativo dipendente dall'iperattivazione della PKA

CONCLUSIONI

Lo studio presentato in questo elaborato descrive la cooperazione tra glucosio e aminoacidi nella sensibilizzazione allo stress e nella promozione dell'invecchiamento attraverso due vie di segnalazione principali. Ciò aumenta le conoscenze attuali circa il ruolo pro-aging di specifici nutrienti e la loro azione attraverso distinti pathway precedentemente identificati come regolatori del processo di invecchiamento.

In particolare, sono stati riconosciuti 3 specifici aminoacidi che in combinazione con il glucosio promuovono la sensibilizzazione agli stress e la riduzione della sopravvivenza di cellule in fase postmitotica: serina, treonina e valina. Allo stesso tempo, l'assenza o la riduzione di uno di questi aminoacidi è in grado di aumentare la sopravvivenza e diminuire l'insorgenza di mutazioni spontanee generalmente associata all'invecchiamento. Anche l'acido glutammico, ma in misura minore, aumenta la sensibilità allo stress ossidativo, in accordo con dati precedenti che mettevano in relazione la sua assenza nel mezzo di coltura con un aumento della sopravvivenza [69, 126]. Di contro, il ruolo della riduzione della metionina nell'estensione della sopravvivenza, riscontrato precedentemente nei roditori [98, 127-129] e nel moscerino della frutta [130], non è stato confermato.

I dati raccolti indicano che i tre aminoacidi identificati agiscono tramite vie di segnalazione diverse: una dipendente dall'attività di TORC1 ed una attivata dagli sfingolipidi attraverso le chinasi Pkh1/2. Treonina e valina sono responsabili dell'attivazione di TORC1 ed è possibile revertire la sensibilizzazione cellulare da loro promossa attraverso la rapamicina, mentre la serina attiva le Pkhs e promuove la sensibilizzazione cellulare attraverso un meccanismo che viene bloccato dall'inibitore della sintesi degli sfingolipidi miriocina. Poiché la serina è substrato dell'enzima serina-palmitoiltransferasi, che catalizza il primo step della sintesi degli sfingolipidi [131], è possibile che il suo effetto sia determinare un aumento della biosintesi degli sfingolipidi che di conseguenza iperattivano le PKhs. Ambedue le vie, attraverso la fosforilazione di due specifici siti, convergono sulla chinasi Sch9 e ne modulano l'attività, cosicché essa rappresenta un punto chiave di integrazione di segnali differenti. Ciò potrebbe spiegare il ruolo principale del pathway TOR/Sch9 nella promozione dell'invecchiamento nel lievito e probabilmente anche negli eucarioti superiori.

Rim15 si è rivelato uno dei principali elementi a valle ad essere influenzato dalla differenziale attivazione di Sch9 in seguito all'esposizione agli aminoacidi. Sia la localizzazione nucleare che la trascrizione di Rim15 vengono inibite dall'attivazione delle vie glucosio-aminoacidi dipendenti e, come ci si può aspettare, ciò influisce sull'attività dei fattori di trascrizione da esso modulati, Gis1 ed Msn2/4, e di conseguenza sulla trascrizione di importanti mediatori della protezione cellulare come SOD2 (Fig. 19).

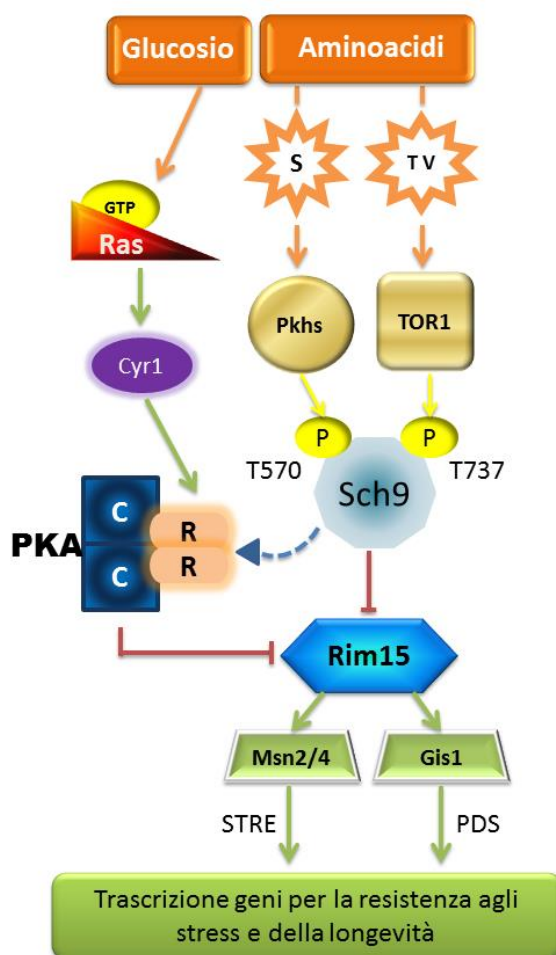


Figura 19. Schema dei pathway attivati dai nutrienti

Diagramma che spiega come specifici nutrienti attivano i pro-aging pathway conosciuti e mette in evidenza il ruolo centrale di Sch9 e Rim15.

Poiché il ruolo pro-aging dei pathway responsabili della crescita e della risposta ai nutrienti è conservato fino agli eucarioti superiori, è possibile che questi meccanismi contribuiscano all'invecchiamento anche nei mammiferi. La conferma

del ruolo pro-aging di specifici aminoacidi anche nei mammiferi potrebbe rappresentare la base per una valida alternativa alla calorie restriction nella modulazione dell'invecchiamento e nella prevenzione delle patologie associate all'età.

BIBLIOGRAFIA

1. Report ISTAT “Noi Italia. 100 statistiche per capire l’Italia in cui viviamo”. 2013.
2. Report ISTAT “Il futuro demografico del Paese. Previsioni regionali della popolazione residente al 2065”. 28 Dicembre 2011.
3. Carta dei diritti dell’anziano. EISS 1995.
4. Strategia e piano d’azione per l’invecchiamento sano in Europa, 2012-2020. OMS 2012.
5. Medawar PB (1952) An Unsolved Problem of Biology (London:Lewis).
6. Williams GC (1957) Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 11: 398–411.
7. Kirkwood TBL (1977) Evolution of ageing. *Nature* 270, 301–304.
8. Sgro CM, Partridge LA (1999) Delayed wave of death from reproduction in *Drosophila*. *Science* 286: 2521–2524.
9. Grube K, Bürkle A (1992) Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11759–11763.
10. Von Zglinicki T (2002) Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 27: 339–344.
11. Tower J (2000) Transgenic methods for increasing *Drosophila* life span. *Mech Ageing Dev* 118:1-4.
12. Arking R, Burde V, Graves K, Hari R, Feldman E, et al (2000) Forward and reverse selection for longevity in *Drosophila* is characterized by alteration of antioxidant gene expression and oxidative damage patterns. *Exp Gerontol* 35: 167-85.
13. Larsen PL (1993) Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8905-9.

-
14. Melov S, Ravenscroft J, Malik S, Gill MS, Walker DW, et al. (2000) Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* 289: 1567-9.
 15. Golden TR, Hinerfeld DA, Melov S (2002) Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell* 1: 117-23.
 16. Martin GM, Oshima J (2000) Lessons from human progeroid syndromes. *Science* 408: 263-266.
 17. Yu CE et al (1996) Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 272: 258-262.
 18. Fukuchi K, Martin GM, Monnat RJ Jr (1989) Mutator phenotype of Werner syndrome is characterized by extensive deletions. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5893-5897.
 19. Epstein CJ, Martin GM, Schultz AL, Motulsky AG (1966) Werner's syndrome a review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process. *Med Baltimore* 45: 177-221.
 20. Fu YH, et al (1992) An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic dystrophy. *Science* 255: 1256-1258.
 21. Seip M, Trygstad O (1996) Generalized lipodystrophy, congenital and acquired (lipoatrophy). *Acta Paediatr Suppl* 413: 2-28.
 22. Garg A, Fleckenstein JL, Peshock RM, Grundy S (1992) Peculiar distribution of adipose tissue in patients with congenital generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 358-361.
 23. Garg A, Wilson R, Barnes R, Arioglu E, Zaidi Z, et al (1999) A gene for congenital generalized lipodystrophy maps to human chromosome 9q34. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 3390-3394.
 24. Brown WT (1992) Progeria: a human-disease model of accelerated ageing. *Am J Clin Nutr* 55: 1222S-1224S.

-
25. Allsopp RC, et al (1992) Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10114-10118.
 26. Wang S, Nishigori C, Yagi T, Takebe H (1991) Reduced DNA repair in progeria cells and effects of gamma-ray irradiation on UV-induced unscheduled DNA synthesis in normal and progeria cells. *Mutat Res* 256: 59-66.
 27. Castrillo JI, Oliver SG (2004) Yeast as a touchstone in post-genomic research: strategies for integrative analysis in functional genomics. *J Biochem and Mol Biol* 37: 93-106.
 28. Orr WC, Sohal RS (1994) Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263: 1128-1130.
 29. Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, et al. (2001) Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* 292: 104-106.
 30. Sun J, Tower J (1999) FLP recombinase-mediate induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. *Mol Cell Biol* 19: 216-228.
 31. Piper MD, Selman C, McElwee JJ, Partridge L, (2008) Separating cause from effect: how does insulin/IGF signalling control lifespan in worms, flies and mice? *J Intern Med* 263: 179.
 32. Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G (1997) *Daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277: 942-946.
 33. Morris JZ, Tissenbaum HA, Ruvkun GA (1996) Phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 382: 536-539.

-
34. Ogg S, et al (1997) The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 389: 994–999.
 35. Larsen PL, Albert PS, Riddle DL (1995) Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 139: 1567–1583.
 36. Dorman JB, Albinder B, Shroyer T, Kenyon C (1995) The *age-1* and *daf-2* genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 141: 1399–1406.
 37. Honda Y, Honda S (2002) Oxidative stress and life span determination in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ann NY Acad Sci* 959: 466-474.
 38. Branicky R, Benard C, Hekimi S (2000) *clk-1*, mitochondria, and physiological rates. *BioEssays* 22: 48–56.
 39. Bluher M, Kahn BB, Kahn CF (2003) Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299: 572-574.
 40. Brown-Borg HM, Borg KE, Meliska CJ, Bartke A (1996) Dwarf mice and the aging process. *Nature* 384: 33.
 41. Brown-Borg HM, Rakoczya SG (1999) Catalase expression in delayed and premature aging mouse models. *Exp Gerontol* 35: 199–212.
 42. Hauck SJ, Bartke A (2005) Effects of growth hormone on hypothalamic catalase and Cu/Zn superoxide dismutase. *Free Radical Biol Med* 28: 970–978.
 43. Bartke A (2005) Minireview: role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in mammalian aging. *Endocrinology* 146: 3718-3723.
 44. Bartke A, et al (1998) Does growth hormone prevent or accelerate aging? *Exp. Gerontol* 33: 675–687.

-
45. Selman C, Tullet JM, Wieser D, Irvine E, Lingard SJ, et al (2009) Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science* 326: 140.
 46. Paolisso G, Gambardella A, Ammendola S, D'Amore A, Varricchio M (1996) Glucose tolerance and insulin action in healthy centenarians. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 270: E890–E896.
 47. Paolisso G, Tagliamonte MR, Rizzo MR, Manzella D, Gambardella A, Varricchio M (1998) Oxidative stress and advancing age: results in healthy centenarians. *J Am Geriatr Soc* 46: 833–838.
 48. Mecocci P, Polidori MC, Troiano L, Cherubini A, Cecchetti R, et al (2000) Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic Biol Med* 28: 1243–1248.
 49. Giampieri C, Mugianesi E, Centurelli M, Franceschi C, Paolisso G (2003) Polymorphic variants of IGF-1R and phosphoinositide 3-kinase genes affect IGF-I plasma levels and human longevity: cues for an evolutionary-conserved mechanism of lifespan control. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3299–3304.
 50. Kuningas M, Mägi R, Westendorp RG, Slagboom PE, Remm M, Van Heemst D (2007) Haplotypes in the human Foxo1a and Foxo3a genes; impact on disease and mortality at old age. *Eur J Hum Genet* 15: 294–301.
 51. Barbieri M, Bonafè M, Franceschi C, Paolisso G (2008) Insulin/IGF-1-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E1064–E1071.
 52. Fontana L, Partridge L, Longo VD (2010) Extending healthy life span from yeast to human. *Science* 328: 321–326.
 53. Kaeberlain M, et al (2005) Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* 310: 1193–1196.
 54. McElwee JJ, et al (2007) Evolutionary conservation of regulated longevity assurance mechanisms. *Genom Biol* 8: R132.

-
55. Tullet JM, et al (2008) Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. *Cell* 132: 1025.
 56. Goffeau A, et al (1997) The yeast genome directory. *Nature* 387: 5-105.
 57. Hartwell LH (2002) Yeast and cancer. *Nobel lecture biosci rep* 22 (3-4): 373.
 58. Bowers K, Stevens TH (2005) Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1744 (3): 438.
 59. Fabrizio P, Longo VD (2003) The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* 2 (2): 73.
 60. Kaerberlein M, Burtner CR, Kennedy BK (2007) Recent Developments in Yeast Aging. *Plos Genetics*. 3(5): e84.
 61. Longo VD (2004) Ras: the other Pro-aging pathway. *Sci Aging Knowl Environ* 39: 36.
 62. Fabrizio P, et al (2001) Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* 292 (5515): 288.
 63. Pedruzzi I, Burckert N, Egger P, De Virgilio C (2000) *Saccharomyces cerevisiae* Ras/cAMP pathway controls post-diauxic shift element-dependent transcription through the zinc finger protein Gis1. *EMBO J* 19: 2569-2579.
 64. Wei M, Fabrizio P, Hu J, Ge H, Cheng C, et al (2008) Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *Plos Genetics* 4(1) e13: 139-149.
 65. Longo VD (1997) The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. Studies of superoxide dismutase, Ras and Bcl-2. *Thesi, University of California Los Angeles*.
 66. Martinez-Pastor MT, Marchler SC, et al (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for

- transcriptional induction through the stress-response element (STRE). EMBO J 15: 2227-2235.
67. Fabrizio P, Liou LL, Moy VN, Diaspro A, Valentine JS, et al (2003) Sod2 function downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. Genetics 163 (1): 35.
 68. Urban J, Soulard A, Huber A, Lippman S, Mukhopadhyay D, et al (2007) Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell 26(5): 663-74.
 69. Powers RW 3rd, Kaerberlein M, Caldwell SD, Kennedy BK, Fields S (2006) Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. Genes Dev 20 (2): 174.
 70. Wei M, Fabrizio P, Madia F, Hu J, Ge H, et al (2009) Tor1/Sch9-regulated carbon source substitution is as effective as calorie restriction in life span extension. Plos Genetics 5 (5): 1.
 71. Flattery-O'Brien JA, Grant CM, Dawes IW (1997) Stationary-phase regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* SOD2 gene is dependent on additive effects of HAP2/3/4/5- and STRE-binding elements. Mol Microbiol 23: 303-312.
 72. Harris N, MacLean M, Hatzianthis K, Panaretou B, Piper PW (2001) Increasing *Saccharomyces cerevisiae* stress resistance, through the overactivation of the heat shock response resulting from defects in the Hsp90 chaperone, does not extend replicative life span but can be associated with slower chronological ageing of non-dividing cells. Mol Genet Genomics 265 (2): 258.
 73. Hecker E, Jungwirth H, Lehmann KA, Maldener C, Fröhlich KU, et al (2004) Chronological aging leads to apoptosis in yeast. J Cell Biol 164 (4): 501.
 74. Toda T, Cameron S, Sass P, Wigler M (1988) SCH9, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein distinct from, but

- functionally and structurally related to cAMP-dependent protein kinase catalytic subunits. *Genes Dev* 2(5): 517-27.
75. Longo VD (2003) The Ras and Sch9 pathways regulate stress resistance and longevity. *Experimental Gerontology* 38: 807–811.
 76. Huang X, Liu J, Dickson RC (2012) Down-regulating sphingolipid synthesis increases yeast lifespan. *PLoS Genet* 8(2): e1002493.
 77. Voordeckers K, Kimpe M, Haesendonckx S, Louwet W, Versele M, Thevelein JM. (2011) Yeast 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) orthologs Pkh1-3 differentially regulate phosphorylation of protein kinase A (PKA) and the protein kinase B (PKB)/S6K ortholog Sch9. *J Biol Chem* 286(25): 22017-27.
 78. Rockenfeller P, Madeo F (2010) Ageing and eating. *Biochim et Biophys Acta* 1803: 499–506.
 79. Longo VD, Fontana L (2010) Calorie restriction and cancer prevention: metabolic and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 31(2): 89-98.
 80. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA (1935) *J Nutr* 10: 63-79.
 81. Weindruch R, Walford (1982) Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science* 215: 1415-1418.
 82. Weindruch R, Walford RL, Fligiel S, Guthrie D (1986) The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J Nutr* 116: 641-654.
 83. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, et al (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in *Rhesus monkeys*. *Science* 325: 201–204.
 84. Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, et al (2012) Impact of caloric restriction on health and survival in *Rhesus monkeys* from the NIA study. *Nature* 489: 318–321.

-
85. Sanchez-Roman I, Barja G (2013) Regulation of longevity and oxidative stress by nutritional interventions: Role of methionine restriction. *Exp Gerontol* 48: 1030–1042.
 86. Omodei D, Fontana L (2011) Calorie restriction and prevention of age-associated chronic diseases. *FEBS Lett* 585: 1537–1542.
 87. Holoszy JO, Fontana L (2007) Caloric restriction in humans. *Exp Gerontol* 42: 709–712.
 88. Fontana L, Klein S (2007) Aging, adiposity, and calorie restriction. *JAMA* 297: 986–994.
 89. Heilbronn LK, DeJonge L, Frisard MI, DeLany JP, Larson-Meyer DE, et al (2006) Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals — a randomized controlled trial. *J Am Med Assoc* 295: 1539–1548.
 90. Houthoofd K, Vanfleteren JR (2006) The longevity effect of dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol* 41: 1026–1031.
 91. Greer EL, Brunet A (2009) Different dietary restriction regimens extend lifespan by both independent and overlapping genetic pathways in *C. elegans*. *Aging Cell* 8: 113–127.
 92. Lee KP, Simpson SJ, Clissold FJ, Brooks R, Ballard JW, et al (2008). Lifespan and reproduction in *Drosophila*: new insights from nutritional geometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 2498–2503.
 93. Wu Z, Liu SQ, Huang D (2013) Dietary restriction depends on nutrient composition to extend chronological lifespan in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 8(5): e64448.
 94. Fanson BG, Taylor PW (2012) Protein: carbohydrate ratios explain life span patterns found in Queensland fruit fly on diets varying in yeast: sugar ratios. *Age* 34: 1361–1368.
 95. Dussutour A, Simpson SJ (2012) Ant workers die young and colonies collapse when fed a high-protein diet. *Proc R Soc B* 279: 2402–2408.

-
96. Grandison RC, Piper MDW, Partridge L (2009) Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila*. *Nature* 462 (7276): 1061-4.
 97. Troen AM, French EE, Roberts JF, Selhub J, Ordovas JM et al (2007) Lifespan modification by glucose and methionine in *Drosophila melanogaster* fed a chemically defined diet. *Age* 29:29–39.
 98. Zimmerman JA, Malloy V, Krajcik R, Orentreich N (2003) Nutritional control of aging. *Experimental gerontology* 38: 47-52.
 99. Wu Z, Song L, Liu SQ, Huang D (2013) Independent and additive effects of glutamic acid and methionine on yeast longevity. *Plos one* 8 (11): e79319.
 100. Lopez-Torres M, Barja G (2008) Lowered methionine ingestion as responsible for the decrease in rodent mitochondrial oxidative stress in protein and dietary restriction. Possible implications for humans. *Biochim and Biophys Acta* 1780: 1337-1347.
 101. Clancy DJ, Gems D, Hafen E, Leevers S.J, Partridge L (2002) Dietary restriction in long-lived dwarf flies. *Science* 296: 319.
 102. Giannakou ME, Goss M, Partridge L (2008) Role of dFOXO in lifespan extension by dietary restriction in *Drosophila melanogaster* : not required, but its activity modulates the response. *Aging Cell* 7: 187–198.
 103. Lin SJ, Defossez PA, Guarente L (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289 (5487): 2126-8.
 104. Jiang JC, Jaruga E, Repnevskaya MV, Jazwinski SM (2000) An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *Faseb J* 14: 2135–2137.
 105. Zaman S, Lippman SI, Zhao X, Broach JR (2008) How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet.* 42: 27-81.

-
106. Budhwar R, Alian L, Hirsh JP (2010) Nutrient Control of yeast PKA activity involves opposing effects on phosphorylation of the bcy1 regulatory subunit. *Mol Biol Cell* 21: 3749-3758.
 107. Zaman S, Lippman S, Schnepfer, Slonim N, Broach J (2009) Glucose regulates transcription in yeast through a network of signaling pathways. *Mol System Biol* 5: 245.
 108. Goldberg AA, Bourque SD, Kyryakov P, Gregg C, Boukh-Viner T, et al (2009) Effect of calorie restriction on the metabolic history of chronologically aging yeast, *Exp Gerontol* 44: 555–571.
 109. Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, et al (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14: 115–132.
 110. Roelants FM, Torrance PD, Thorner J (2004) Differential roles of PDK1- and PDK2-phosphorylation sites in the yeast AGC kinases Ypk1, Pkc1 and Sch9. *Microbiology* 150: 3289-304.
 111. Longtine MS, McKenzie A, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, et al (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 953–961.
 112. Hu J, Wei M, Mirisola MG, Longo VD (2013) Assessing chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol* 965: 463-72.
 113. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
 114. Lin SJ, Kaeberlein M, Andalis AA, Sturtz LA, Defossez PA, et al (2002) Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* life span by increasing respiration. *Nature* 418: 344-8.
 115. Souillard A, Cremonesi A, Moes S, Schütz F, Jenö P, et al (2010) The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. *Mol Biol Cell* 21: 3475-86.

-
116. Schmitt AP, McEntee K (1996) Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5777-5782.
 117. Görner W, Durchschlag E, Martinez-Pastor MT, Estruch F, Ammerer G, et al (1998) Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev* 12: 586-597.
 118. Buchan JR, Parker R (2009) Eukaryotic stress granules: the ins and out of translation. *Mol Cell* 36(6): 932.
 119. Swisher KD, Parker R (2010) Localization to, and effects of Pbp1, Pbp4, Lsm12, Dhh1, and Pab1 on stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 5(4): e10006.
 120. Fischer C, Valerius O, Rupprecht H, Dumkow M (2008) Post transcriptional regulation of FLO11 upon amino acid starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 8: 225-236.
 121. Van de Velde S, Thevelein JM (2008) Cyclic AMP-protein kinase A and Snf1 signaling mechanisms underlie the superior potency of sucrose for induction of filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 7: 286-293.
 122. Amitrano AA, Saenz DA, Ramos EH. (1997) GAP1 activity is dependent on cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 151: 131-133.
 123. Garrett JM (2008) Amino acid transport through the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1 permease is controlled by the Ras/cAMP pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 496-502.
 124. Werner-Washburne M, Brown D, Braun E (1991) Bcy1, the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in yeast, is differentially modified in response to the physiological status of the cell. *J Biol Chem* 266(29): 19704-9.
 125. Henry SA, et al (2012) Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190(2): 317-49.

-
126. Crespo JL, Powers T, Fowler B, Hall MN (2002) The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6784-6789.
 127. De Marte ML, Enesco HE (1986) Influence of low tryptophan diet on survival and organ growth in mice. *Mech Ageing Dev* 36: 161.
 128. Orentreich N, Matias JR, De Felice A, Zimmerman JA (1993) Low methionine ingestion by rats extends life span. *J Nutr* 123: 269-74.
 129. Miller RA, Buehner G, Chang Y, Harper JM, Sigler R, et al (2005) Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell* 4: 119.
 130. Bruhat A, Chérasse Y, Chaveroux C, Maurin AC, Jousse C, et al (2009) Amino acids as regulators of gene expression in mammals: molecular mechanisms. *Biofactors* 35: 249-257.
 131. Ikushiro H, Hayashi H (2011) Mechanistic enzymology of serine palmitoyl transferase. *Biochim Biophys Acta* 1814: 1474-80.

RINGRAZIAMENTI

Tengo a ringraziare la professoressa Anna Maria Puglia che per prima ha creduto in me ed il professor Mario Mirisola che è sempre stato presente in questi tre anni di formazione professionale e personale.

Ringrazio inoltre il professore Valter Longo per il supporto non solo scientifico che ha dato alla mia ricerca, la dottoressa Paola Fabrizio, il dottor Min Wei e la dottoressa Jia Hu con cui ho condiviso i risultati di questo lavoro.